

Université de Sherbrooke

**Analyse quantitative des isoformes méthylés et non-méthylés du globotriaosylcéramide
par spectrométrie de masse en tandem pour la maladie de Fabry**

Par
Mona Abaoui
Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Sherbrooke, Québec, Canada
Juin 2015

Membres du jury d'évaluation

Christiane Auray-Blais, LL.M., Ph.D., Département de pédiatrie, Université de Sherbrooke
Darel Hunting, Ph.D., Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Université de Sherbrooke
Dr Joe TR Clarke, Département de pédiatrie, Université de Toronto

© Mona Abaoui, 2015

À Maman et Papa,

À Linda,

À Christiane.

RÉSUMÉ

Analyse quantitative des isoformes méthylés du globotriaosylcéramide et de la créatinine urinaire par spectrométrie de masse en tandem pour la maladie de Fabry

Par

Mona Abaoui

Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en Sciences des radiations et imagerie biomédicale, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La maladie de Fabry est une maladie génétique lysosomale causée par une mutation dans le gène *GLA* codant pour la protéine alpha-galactosidase A. Cette déficience a pour effet de mener à l'accumulation de plusieurs métabolites dans les liquides biologiques et différents organes. Les patients présentent, entre autres, de l'acroparesthésie, des angiokératomes, des problèmes ophtalmologiques, ainsi que des problèmes rénaux, cardiaques et du système nerveux central pouvant mener à une mort prématurée, si le patient n'est pas traité. Afin de permettre un dépistage, un diagnostic et un suivi adéquat des patients, plusieurs biomarqueurs spécifiques à la maladie sont utilisés. Présentement, le dépistage à haut risque est fait à l'aide du globotriaosylcéramide (Gb₃), du globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) et de ses analogues. Toutefois, il arrive que ces biomarqueurs ne soient pas retrouvés en quantité élevée chez certains patients, d'où l'intérêt de continuer les investigations pour trouver d'autres biomarqueurs qui seraient plus spécifiques face à la sévérité et à la progression de la maladie. Une récente étude métabolomique effectuée par spectrométrie de masse en temps de vol a mis en évidence la présence de plusieurs biomarqueurs qui n'avaient pas encore été identifiés chez les patients Fabry. Parmi ceux-ci, se trouve une classe de biomarqueurs appelés les isoformes méthylés du Gb₃ (masse/charge (*m/z*): 1150, 1148, 1122, 1120, 1094, 1066, and 1038). Ceux-ci présentent un intérêt particulier puisqu'ils semblent faire partie de la voie métabolique entre le Gb₃ et le lyso-Gb₃. Les objectifs de ce projet sont donc: 1) de développer et de valider une méthode d'analyse quantitative des isoformes méthylés et non-méthylés du Gb₃ et de la créatinine urinaire par spectrométrie de masse en tandem; 2) de doser ces biomarqueurs sur une large cohorte de patients atteints de la maladie de Fabry et de contrôles sains; 3) de comparer la concentration des isoformes méthylés du Gb₃ urinaire avec la concentration de Gb₃ non-méthylés et; 4) d'identifier s'il y a des corrélations entre lesdits biomarqueurs quantifiés et l'âge, le sexe, le traitement et le génotype des patients. Une méthode de quantification par spectrométrie de masse en tandem a été développée et validée, en multiplex avec la créatinine urinaire. En plus d'avoir le potentiel d'aider au dépistage à haut risque, ces biomarqueurs ont permis d'établir des corrélations avec la réponse au traitement et nos résultats montrent qu'ils sont anormalement excrétés chez les patients portant la mutation à variante cardiaque p.N215S, pour qui les niveaux de Gb₃ non-méthylés sont habituellement normaux.

Mots clés : Maladie de Fabry, maladies lysosomales, spectrométrie de masse en tandem, biomarqueurs, dépistage à haut risque, isoformes méthylés du Gb₃

TABLES DES MATIÈRES

Résumé	iii
Tables des matières	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
INTRODUCTION	
	1
<i>1.1 Les maladies génétiques métaboliques</i>	<i>1</i>
1.1.1 Aspects généraux	1
1.1.2 Principes de la transmission génétique	2
<i>1.2 Les maladies lysosomales</i>	<i>3</i>
1.2.1 Lysosome	3
1.2.2 Pathologie lysosomale et manifestations cliniques	5
1.2.3 Métabolisme enzymatique	8
1.2.4 Traitements des maladies lysosomales	8
<i>1.3 La maladie de Fabry</i>	<i>11</i>
1.3.1 Physiopathologie	11
1.3.1 Signes et symptômes	12
<i>1.4 Dépistage et diagnostic</i>	<i>15</i>
1.4.1 Dépistage populationnel	15
1.4.2 Dépistage à haut risque	16
1.4.3 Diagnostic	17
1.4.4 Conseil génétique	19
<i>1.5 Traitements pour la maladie de Fabry</i>	<i>19</i>
1.5.1 Thérapie enzymatique de remplacement	19
1.5.2 Thérapie génique	20
1.5.3 Thérapies complémentaires	21

<i>1.6. Les biomarqueurs en santé</i>	<i>21</i>
1.6.1 Définition	21
1.6.2 Caractéristiques d'un biomarqueur idéal	22
1.6.3 Biomarqueurs pour la maladie de Fabry	22
<i>1.7 La spectrométrie de masse en tandem</i>	<i>28</i>
1.7.1 Historique de la spectrométrie de masse	28
1.7.2 Principes de base et composantes d'un spectromètre de masse	29
1.7.4 Électronébulisation	33
1.7.5 Analyseur quadripolaire	34
<i>1.8 Développement et validation d'une méthode en spectrométrie de masse en tandem</i>	<i>39</i>
1.8.1 Principes du développement et d'optimisation d'une méthode par spectrométrie de masse	39
1.8.2 Principes de la validation d'une méthode	45
<i>1.9 Présentation du projet</i>	<i>50</i>
1.9.1 Problématique et hypothèse	50
1.9.2 Objectifs	52
1.9.3 Perspectives du projet face au domaine clinique	53
ARTICLE 1	54
Tandem Mass Spectrometry Multiplex Analysis of Methylated and Non-Methylated Urinary Gb ₃ Isoforms in Fabry Disease Patients	
DISCUSSION	79
CONCLUSION	91
Remerciements	94
Liste des références	95

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Réaction métabolique anormale.	1
Figure 2	Voies de digestion lysosomale.	4
Figure 3	Fonction de catalyse de l'enzyme alpha-galactosidase A sur un glycosphingolipide.	11
Figure 4	Déroulement du dépistage et du diagnostic de la maladie de Fabry.	18
Figure 5	a) Structure chimique du globotriaosylcéramide (Gb ₃); et b) Structure chimique du galabiosylcéramide (Ga ₂).	23
Figure 6	Structure chimique du globotriaosylsphingosine (lyso-Gb ₃).	25
Figure 7	Structures des isoformes et analogues du Gb ₃ déterminés par des études de fragmentation en spectrométrie de masse en temps de vol.	27
Figure 8	Spectromètre de masse en tandem Xevo-TQS (à droite) couplé à un système de chromatographie en phase liquide à ultra performance ACQUITY UPLC I-Class (à gauche).	30
Figure 9	Schéma illustrant les composantes de base d'un spectromètre de masse.	31
Figure 10	Exemple d'un chromatogramme obtenu pour les 7 isoformes méthylés du Gb ₃ suite à l'analyse urinaire d'un patient non traité atteint de la maladie de Fabry.	32
Figure 11	Principe de l'électronébulisation en mode positif.	33
Figure 12	Principe d'un quadripôle.	35
Figure 13	Composantes de l'analyseur d'un spectromètre de masse en tandem.	35
Figure 14	Intensité du signal obtenu par rapport au voltage de collision pour 7 ions fragments de la molécule mère de Gb ₃ (d18:1)(C22:0)Me.	36
Figure 15	Spectres obtenus pour l'isoforme Gb ₃ (d18:1)(C22:0)Me en a) «MS Scan», en b) «Single Ion Recording» et en c) «Daughter Scan».	38
Figure 16	Principaux paramètres optimisés lors du développement d'une méthode.	40

- Figure 17 Graphiques montrant l'intensité du signal obtenu en fonction du voltage pour certains paramètres optimisés sur le spectromètre de masse en tandem Xevo TQ-S lors du développement de la méthode à partir de l'isoforme Gb₃(d18:1)(C22:0)Me: a) l'optimisation du voltage du cône pour la céramide; b) l'optimisation du voltage du capillaire pour la céramide; c) l'optimisation du voltage d'extraction pour la céramide; et d) l'optimisation du voltage de la lentille RF pour la sphingosine. Le cercle vert représente l'intensité maximale et donc le voltage sélectionné pour la méthode développée dans ce projet. 41
- Figure 18 Impact du gradient de phases mobiles sur la chromatographie démontré par deux exemples où la quantité de solvant organique a été augmentée de 10%, soit de a) 50% à b) 60%. Le bruit de fond diminue considérablement lorsqu'il y a une augmentation de la quantité de solvant organique dans la phase mobile. 42
- Figure 19 Chromatogrammes obtenus pour différentes combinaisons de phases mobiles en UPLC pour l'isoforme Gb₃(d18:1)(C22:0)Me. Trois combinaisons de solvants ont été testées : a) Acétonitrile/Eau/Ammonium formate; b) Acétonitrile/Eau et; c) Méthanol/Eau/Acide formique/Ammonium formate. 43
- Figure 20 Graphiques obtenus lors de l'optimisation de la méthode d'extraction des échantillons d'urine pour les isoformes méthylés du Gb₃ : a) Impact de la sonication ou non; b) des solvants d'extraction utilisés; c) du temps d'incubation des échantillons. 44
- Figure 21 Résultats obtenus lors de l'évaluation de la précision intra-jour (n=5) et inter-jours (n=5) pour la créatinine urinaire lors de cette étude. La variation entre les analyses ne doit pas excéder 15% afin que la méthode soit jugée précise. 46
- Figure 22 Deux tests démontrant la présence d'un effet de matrice. Le chromatogramme en rouge représente le standard interne, pour lequel la concentration est la même pour les Figures a) et b). Les résultats en vert représentent deux urines ayant la même concentration en biomarqueurs, mais pour lesquelles la concentration en créatinine est différente. La Figure a), provenant d'un échantillon avec une concentration en créatinine élevée, montre une suppression ionique puisque l'intensité du signal est diminuée par rapport au standard interne, ce qui n'est pas le cas pour la Figure b), provenant d'un échantillon de faible concentration en créatinine. 47

Figure 23	Résultats obtenus pour l'évaluation de la stabilité à différentes températures et à différents délais de temps, pour les isoformes méthylés et non-méthylés du Gb ₃ pour cette étude. La variation entre les analyses ne doit pas excéder 15% afin que les échantillons soient jugés stables à certaines conditions données. La concentration obtenue suite à une série de trois congélation/décongélation est présentée et montre que celles-ci n'ont aucun impact sur la conservation de l'échantillon, puisque la concentration reste la même. Il n'y a donc aucun risque de dégradation de l'échantillon lorsque ceux-ci sont décongelés et recongelés trois fois.	48
Figure 24	Test d'adhésion aux parois de verre et de plastique pour les isoformes méthylés et non-méthylés du Gb ₃ selon le nombre de transferts effectués. Chaque point représente l'aire totale des isoformes méthylés et non-méthylés du Gb ₃ en fonction du nombre de transferts d'un vial à l'autre.	49
Figure 25	Comparaison des concentrations de créatinine urinaire obtenues pour 9 patients avec la méthode enzymatique à la créatinine aminohydrolase et avec la méthode développée par spectrométrie de masse en tandem dans cette étude.	50
Figure 26	Structures chimiques des 7 isoformes méthylés du Gb ₃ avec leur variation sur l'acide gras (-R) et leur masse respective (<i>m/z</i>).	51
Figure 27	Exemple du spectre de fragmentation de l'isoforme Gb ₃ (d18:1)(C22:0)Me.	51
Figure 28	Métabolisme intermédiaire possible entre le globotriaosylcéramide et le globotriaosylsphingosine, impliquant les isoformes méthylés du Gb ₃ .	52

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Classement des principales maladies lysosomales selon leur sous-groupe.	6
Tableau 2	Prévalence de la maladie de Fabry dans certaines populations à risque.	17
Tableau 3	Modification sur la sphingosine des analogues du globotriaosylsphingosine (lyso-Gb ₃) et leur masse respective (m/z).	25
Tableau 4	Éléments historiques de la spectrométrie de masse.	28
Tableau 5	Paramètres évalués lors de la validation analytique.	45

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATP	Adénosine triphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
TER	Thérapie enzymatique de remplacement
Gb ₃ ou GL-3	Globotriaosylcéramide
Ga ₂	Galabiosylcéramide
Lyso-Gb ₃	Globotriaosylsphingosine
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
<i>m/z</i>	Rapport masse sur la charge d'un ion
MTBE	Méthyl tert-butyl éther
ACN	Acétonitrile
ESI	Ionisation par électronébulisation
FAB	Ionisation par bombardement d'atomes rapides
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
UPLC	Chromatographie liquide en ultra haute performance
MRM	"Multiple Reaction Monitoring"
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
GC	Chromatographie en phase gazeuse
IE	Ionisation électronique
IC	Ionisation chimique
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
API	Ionisation à pression atmosphérique
FT-ICR	Analyseur à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier

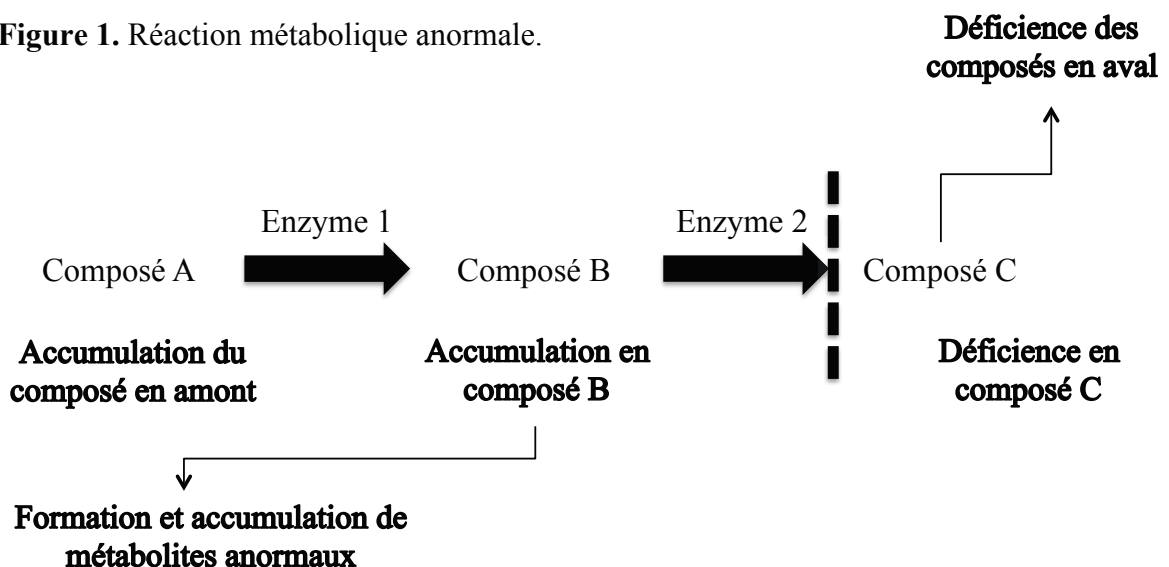
INTRODUCTION

1.1 Les maladies génétiques métaboliques

1.1.1 Aspects généraux

Les maladies génétiques sont principalement caractérisées par l'altération de la fonction d'une protéine due à la présence d'une ou de plusieurs mutations au sein du gène responsable de sa transcription. Lorsque cette déficience touche une protéine impliquée dans le métabolisme, celle-ci peut mener à l'apparition d'une maladie génétique métabolique, ou erreur innée du métabolisme (Saudubray *et al.*, 2012). Habituellement, une réaction métabolique implique plusieurs protéines, principalement des enzymes, dont le rôle est de catalyser les réactions de dégradation, de recyclage et de récupération. Les métabolites n'ayant plus d'utilité métabolique peuvent ainsi être éliminés. Lorsque l'une de ces protéines est déficitaire, la réaction métabolique ne peut exercer sa fonction de dégradation et il y a accumulation de produits non dégradés. La Figure 1 présente une réaction métabolique anormale, dans laquelle l'enzyme 2 est déficitaire. Puisque celle-ci ne peut catalyser la réaction, les composés se trouvant en aval de celle-ci se retrouvent en faible quantité, ce qui mène alors à un impact sur les réactions métaboliques conjointes.

Figure 1. Réaction métabolique anormale.



D'autre part, le composé B, ne pouvant être dégradé, est accumulé au sein des cellules, ayant pour conséquence la formation et l'accumulation de métabolites anormaux. L'impact sur les autres composés en amont, par exemple le composé A, est considérable et peut avoir des effets sur le fonctionnement métabolique habituel. Ces déficiences enzymatiques touchent habituellement la totalité des cellules. Les conséquences sont donc multisystémiques, d'expression, de présentation et de pronostic variables, allant des troubles neurologiques aux troubles cardiaques (Brunetti-Pierri *et al.*, 2012).

1.1.2 Principes de la transmission génétique

Trois mécanismes de transmission sont principalement observés et sont responsables de la transmission du gène muté d'un parent à un enfant : la transmission autosomique dominante, la transmission autosomique récessive et la transmission liée à l'X. Dans le premier cas, la présence d'une seule copie du gène muté, transmis par l'un des deux parents, mène directement à l'expression de la maladie. La probabilité qu'un enfant soit atteint de la maladie est donc d'une sur deux. Dans le cas de la transmission autosomique récessive, la présence d'une seule copie du gène muté ne mène pas à la pathologie car les deux parents doivent être porteurs d'une copie mutée du gène et transmettre cette copie à l'enfant pour que celui-ci exprime la maladie. Le risque d'être atteint est de 25%. Pour ces deux modes de transmissions, les filles et les garçons ont autant de chance d'être atteints, contrairement aux maladies liées à l'X où habituellement, les garçons seulement sont atteints (Read et Donnai, 2009).

La transmission liée à l'X caractérise les maladies génétiques pour lesquelles le gène muté est situé sur le chromosome sexuel féminin. La transmission d'un chromosome X muté d'une mère à son fils mène directement à l'expression de la maladie, tandis que la transmission de ce chromosome à une fille amène celle-ci au stade de porteuse seulement. Toutefois, pour certaines maladies liées à l'X, l'expression de certains symptômes cliniques peut aussi être observée chez les femmes. Le risque pour une fille d'être porteuse et pour un garçon d'être atteint est donc de 50% (MacDermot *et al.*, 2001).

1.2 Les maladies lysosomales

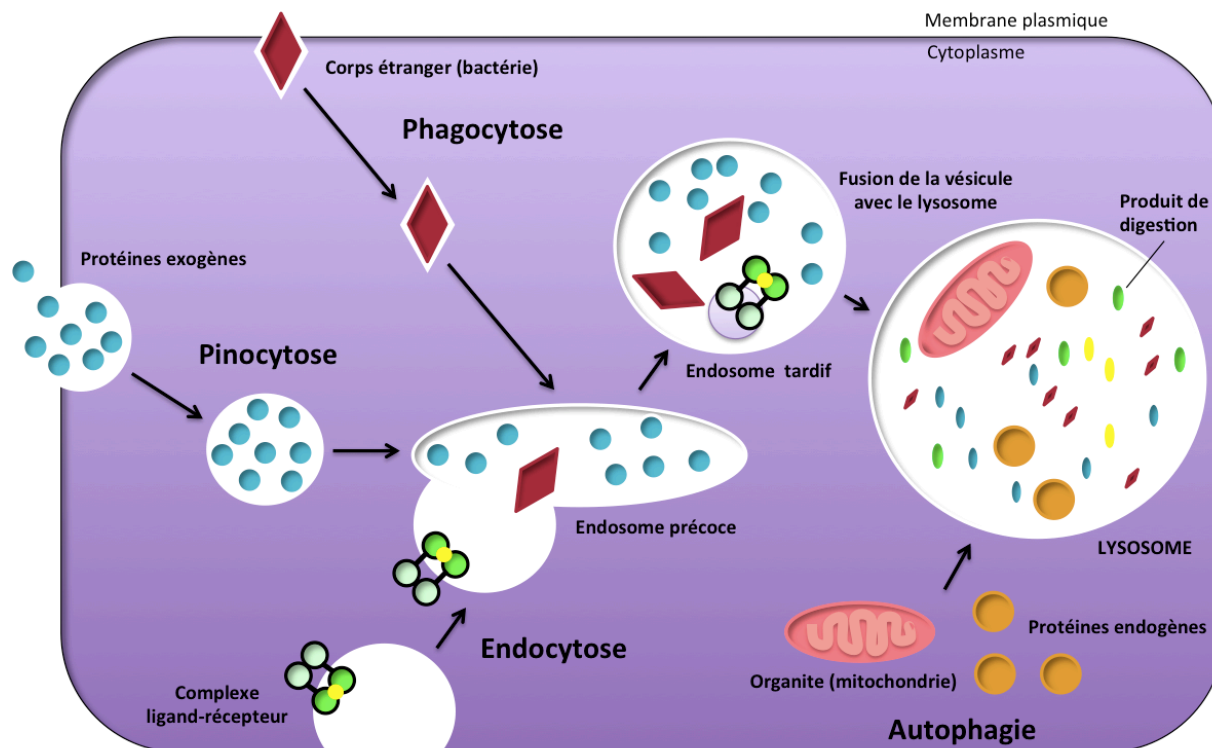
1.2.1 Lysosome

Le lysosome est l'organite impliqué dans la digestion cellulaire de macromolécules, formé à partir du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Chaque cellule, à l'exception des hématies, contient plus d'une centaine de lysosomes, principalement constitués d'hydrolases. Afin de permettre les réactions d'hydrolyse nécessaires à la dégradation des métabolites, le pH interne des lysosomes est préservé autour de 5, grâce aux pompes à protons et aux canaux ioniques situés sur sa membrane. Afin d'empêcher sa propre digestion, la paroi interne du lysosome est formée d'une couche glucidique de façon à ne pas pouvoir être dégradée par les enzymes lysosomales. Le cytoplasme et les autres organites de la cellule n'étant toutefois pas insensibles à un pH aussi acide, la rupture membranaire et le déversement du contenu lysosomal dans le cytoplasme peuvent causer des dommages importants à la cellule, voire une autolyse complète de la cellule (Parenti, Andria et Ballabio, 2015).

La formation du lysosome peut se résumer en trois grandes étapes: 1) Dans le réticulum endoplasmique, les hydrolases lysosomales sont synthétisées par les ribosomes. Des chaînes d'oligosaccharides, soient des groupements mannose-6-phosphate inactifs, sont ensuite jointes aux hydrolases afin de permettre leur reconnaissance; 2) L'interaction avec le récepteur à mannose-6-phosphate, situé sur la membrane interne de l'appareil de Golgi, permet au complexe de quitter l'organite pour être transporté vers l'appareil de Golgi. Dès leur sortie du réticulum endoplasmique, les hydrolases sont entourées d'un complexe protéique permettant leur transport et leur protection et; 3) Le groupement mannose-6-phosphate situé sur les hydrolases sera activé dans l'appareil de Golgi, permettant la sortie des enzymes de l'organite. Elles seront amenées aux endosomes à l'aide de vésicules de transport avec lesquelles elles fusionneront. L'endosome formera un lysosome lorsqu'il aura acquis toutes les hydrolases nécessaires à son fonctionnement (Cooper et Hausman, 2007).

Les métabolites peuvent être amenés au lysosome selon trois voies: l'endocytose où les molécules spécifiques à dégrader vont être amenées dans un endosome contenant les hydrolases afin d'y être dégradées; la pinocytose selon laquelle de petites molécules seront absorbées de façon non spécifique à la membrane du lysosome, en formant une vésicule; et l'autophagie par laquelle les organites de la cellule sont dégradés dans le lysosome en fusionnant avec un endosome. La phagocytose, aussi effectuée à l'aide du lysosome, est un moyen de défense de l'organisme permettant l'élimination des substances étrangères. Les voies de digestion du lysosome sont présentées dans la Figure 2. Par la suite, les hydrolases (principalement des lipases, des protéases, des nucléases et des glycosidases) effectueront la dégradation des composés complexes (lipides, protéines, ADN, glucides) en molécules simples (acides gras, acides aminés, nucléotides, sucres) pour permettre leur sortie par diffusion simple ou à l'aide de récepteurs. Ceux-ci pourront alors être recyclés ou éliminés. Le manque ou le dysfonctionnement d'une enzyme digestive lysosomale est la cause des maladies lysosomales, aussi appelées maladies de surcharge (Reece et Campbell, 2012).

Figure 2. Voies de digestion lysosomale.



1.2.2 Pathologie lysosomale et manifestations cliniques

Les maladies lysosomales regroupent plus de 60 maladies pour lesquelles le métabolisme impliquant une surcharge de substrat dans le lysosome est à l'origine de l'affection (Cox et Cachon-Gonzalez, 2012). C'est vers 1880 que les premières maladies lysosomales ont été cliniquement observées. La maladie de Gaucher et la maladie de Tay-Sachs ont été les premières à être étudiées (Futerman et van Meer, 2004). Bien que la présence d'hydrolases déficitaires au sein du lysosome soit souvent la cause de ces maladies, les mutations dans certaines protéines non lysosomales, enzymes ou protéines non enzymatiques solubles ou intégrées à la membrane peuvent mener à un fonctionnement anormal du lysosome (Mehta et Winchester, 2012). Ces maladies sont presque exclusivement monogéniques et la totalité sont à caractères récessifs, à l'exception de la maladie de Fabry, de la maladie de Hunter (mucopolysaccharidose de type II) et de la maladie de Danon qui sont liées à l'X. L'incidence globale de l'ensemble des maladies lysosomales s'élève à 1/7000, mais ne cesse d'augmenter due à l'implantation de dépistage populationnel dans certains pays (Meikle *et al.*, 1999). Le Tableau 1 répertorie les principales maladies lysosomales, ainsi que l'enzyme déficitaire et les substrats accumulés.

Tableau 1. Classement des principales maladies lysosomales selon leur sous-groupe.

SPHINGOLIPIDOSE		
Maladies	Protéine défectueuse	Métabolites accumulés
Fabry	α -Galactosidase A	Glycosphingolipides
Farber	Ceramidase	Céramide
Gaucher	β -Glucosidase	Glucosylcéramide
Niemann–Pick A et B	Sphingomyelinase	Sphingomyéline
Déficiences en activateur des sphingolipides	Activateur des sphingolipides	Glycolipides
GM1 gangliosides	β -Galactosidase	GM1 ganglioside
GM2 gangliosides (Tay-Sachs)	β -Hexosaminidase A	GM2 ganglioside et glycosphingolipides
GM2 gangliosides (Sandhoff)	β -Hexosaminidase A et B	GM2 ganglioside et glycosphingolipides
GM2 gangliosides	Activateur de GM2	GM2 ganglioside et glycosphingolipides
MUCOPOLYSACCHARIDOSES		
Maladies	Protéine défectueuse	Métabolites accumulés
MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/Scheie)	α -Iduronidase	Dermatan sulphate et heparan sulphate
MPS II (Hunter)	Iduronate-2-sulphatase	Dermatan sulphate et heparan sulphate
MPS IIIA (Sanfilippo)	Sulphamidase	Heparan sulphate
MPS IIIB (Sanfilippo)	<i>N</i> -Acetyl- α -glucosaminidase	Heparan sulphate
MPS IIIC (Sanfilippo)	α -glucosamide <i>N</i> -acetyltransferase	Heparan sulphate
MPS IIID (Sanfilippo)	<i>N</i> -Acetylglucosamine-6-sulphatase	Heparan sulphate
Morquio-A	<i>N</i> -Acetylgalactosamine-6-sulphate-sulphatase	Keratan sulphate et chondroïtin-6-sulphate
Morquio-B	β -Galactosidase	Keratan sulphate
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	<i>N</i> -Acetylgalactosamine-4-sulphatase	Dermatan sulphate
MPS VI (Sly)	β -Glucuronidase	Dermatan sulphate et heparan sulphate, chondroïtin-4- and -6-sulphates
OLIGOSACCHARIDOSES ET GLYCOPROTÉINOSES		
Maladies	Protéine défectueuse	Métabolites accumulés
Pompe	α -Glucosidase	Glycogène
DÉFAUT DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE ET DU TRANSPORT		
Maladies	Protéine défectueuse	Métabolites accumulés
Cystinose	Cystinosine	Cystine
Danon	LAMP2	Glycogène
Maladie de stockage de l'acide sialique libre	Sialine	Acide sialique
Mucopolipidose IV	Mucopolipine-1	Lipides et acides mucopolysaccharides
Niemann–Pick de type C	NPC 1 et 2	Cholestérol et sphingolipides
AUTRES		
Maladies	Protéine défectueuse	Métabolites accumulés
Galactosialidose	Cathepsine A	Sialyloligosaccharides
Mucopolidoses (ML II et III)	<i>N</i> -acetylglucosamine-1-phosphotransférase	Oligosaccharides, mucopolysaccharides et lipides
Déficit multiple en sulfatases	FGE	Sulphatides
Céroïde-lipofuscinose neuronale 1	Palmitoylthioesterase-1	Lipofuscine
Céroïde-lipofuscinose neuronale 2	CLN2	Lipofuscine
Céroïde-lipofuscinose neuronale 3	Transporteur d'arginine	Lipofuscine

Les corrélations génotype-phénotype sont difficiles à être démontrées pour la plupart des maladies lysosomales. Conséquemment, malgré une connaissance accrue des symptômes cliniques des maladies lysosomales, il est difficile de pouvoir établir un pronostic précis et personnalisé des patients en fonction de leur mutation (Futerman et van Meer, 2004). Bien que l'aspect métabolique soit sensiblement similaire pour l'ensemble des maladies lysosomales, celles-ci n'ont souvent pas la même présentation clinique, le même pronostic et conséquemment, la même prise en charge et suivi des patients. De plus, deux patients présentant la même affection peuvent exprimer celle-ci de façons différentes, puisque plusieurs mutations peuvent être à l'origine d'une même maladie (Futerman et van Meer, 2004). Une mutation non-sens pour laquelle un codon-stop est inséré et empêche la traduction complète de la protéine risque d'être plus néfaste qu'une mutation faux-sens, où un acide aminé est remplacé par un autre, si cette mutation n'est pas située dans le site catalytique de l'enzyme. Pour certaines maladies lysosomales, comme la maladie de Fabry, deux frères portant la même mutation peuvent présenter un phénotype différent, montrant l'influence possible de l'environnement et de l'entité génomique sur le développement de la maladie (Read et Donnai, 2009). La présence possible de gènes modificateurs peut aussi être envisagée. Dans tous les cas, les symptômes cliniques sont causés par l'accumulation, dans les lysosomes, de métabolites ne pouvant être dégradés à cause de la déficience enzymatique. Ceux-ci, accumulés sous forme de vacuoles, s'emmagasineront tranquillement dans le lysosome jusqu'à en altérer la fonction. Lorsqu'une hydrolase permet la dégradation de différents substrats, il n'est pas rare de voir une accumulation de plusieurs métabolites (Futerman et van Meer, 2004). Les maladies lysosomales sont multisystémiques et les symptômes touchent donc pratiquement tous les systèmes. Les atteintes peuvent être d'ordre neurologique, respiratoire, rénal, gastrointestinal, ophtalmologique et psychiatrique (Parenti *et al.*, 2015).

Étant donné la grande variabilité de la présentation clinique, le diagnostic de ce type de maladie est souvent long à établir. Une fois celui-ci posé, les manifestations liées à la maladie ne s'atténuent pas et la qualité de vie des patients, le fardeau personnel et social sont drastiquement altérés (Cox et Cachon-Gonzalez, 2012), si un traitement n'est pas offert.

1.2.3 Métabolisme enzymatique

En théorie, il devrait exister une maladie génétique par enzyme lysosomale. Certes, certaines mutations ne sont pas compatibles avec la vie. Par exemple, aucune mutation liée avec le complexe enzymatique H⁺-ATPase n'a été répertoriée. Ce complexe a pour fonction de permettre le maintien d'un pH acide au sein du lysosome. Puisqu'un pH acide est nécessaire pour l'activité de toutes les hydrolases, une mutation dans ce complexe amènerait un dysfonctionnement général de l'ensemble des hydrolases et un nombre très important de métabolites serait accumulé, ce qui serait fatal au stade embryonnaire (Futerman et van Meer, 2004). Certaines mutations mènent à une perte complète de l'activité enzymatique tandis que d'autres vont mener à une simple diminution de l'activité enzymatique. Toutefois, ce n'est pas parce qu'il y ait une diminution de l'activité enzymatique qu'une personne présente automatiquement une maladie lysosomale. De fait, une activité enzymatique résiduelle de 5% à 10% est parfois suffisante pour éviter l'apparition de symptômes sévères liés à la maladie (Clarke, 2007).

Bien que ce soit l'accumulation de substrat qui soit la cause première de l'apparition de la maladie, les études énoncent l'hypothèse que certaines conséquences secondaires sont observables. Le dysfonctionnement d'une voie métabolique peut avoir comme effet d'engendrer des modifications dans d'autres voies biochimiques, en altérant l'expression de certains gènes et en amenant des pathologies tissulaires. La stabilité et la perméabilité du lysosome peuvent être ainsi compromises, pouvant avoir comme conséquence la libération d'hydrolases dans le cytosol. Aussi, il serait possible que l'accumulation de métabolites dans le lysosome amène un blocage du transport intracellulaire et extracellulaire, due à la surcharge lysosomale (Futerman et van Meer, 2004).

1.2.4 Traitements des maladies lysosomales

Bien qu'aucun traitement curatif ne soit disponible actuellement, plusieurs traitements visant à diminuer la quantité de substrats accumulés, à augmenter l'activité enzymatique ou

à réduire les symptômes de la maladie sont disponibles. Deux classes de traitements sont donc offertes aux patients : ceux visant la cause de la maladie et ceux visant les conséquences de celle-ci.

La thérapie enzymatique de remplacement (TER) est, à ce jour, le traitement le plus répandu et celui montrant les meilleurs résultats (Hollak et Weinreb, 2015). Le patient reçoit, par infusion, une enzyme recombinante afin que celle-ci puisse aller exercer la fonction habituelle de l'enzyme déficiente. La première TER a été développée vers les années 1990 pour la maladie de Gaucher (Barton *et al.*, 1991). Actuellement, celle-ci est disponible pour la maladie de Fabry, la maladie de Pompe, la maladie de Gaucher et les MPS de type I, II, IVA et VI (Hendriksz *et al.*, 2014; Parenti *et al.*, 2015). Elle est actuellement en essai clinique pour, entre autres, la leucodystrophie métachromatique, les mucopolysaccharidoses de type VII et IIIA et la déficience en acide lipase (Cox et Cachon-Gonzalez, 2012; Parenti *et al.*, 2015). Puisque les protéines recombinantes sont de grosses molécules et qu'elles ne diffusent pas passivement à travers les membranes et dans certains tissus, comme le cerveau, des études sont encore effectuées pour optimiser la biodisponibilité et la diffusion de ces protéines (Parenti *et al.*, 2015). Les patients présentent parfois une réponse immunologique contre ces molécules, ce qui peut limiter l'efficacité de la TER et mener à la cessation de la prise de la TER pour le patient (Parenti *et al.*, 2015). Le coût de la TER, s'élevant à plusieurs centaines de milliers de dollars par patient annuellement, peut mener à une restriction de l'accès à ladite thérapie dans certains pays (Parenti *et al.*, 2015).

Trois principaux traitements connexes sont aussi disponibles ou à l'étude pour certaines maladies lysosomales, conjointement ou en remplacement de la TER: 1) la thérapie par chaperons; 2) la thérapie par réduction de substrat; et 3) la thérapie par régulateur de la protéostasie (Parenti *et al.*, 2015). Les chaperons ont comme fonction de venir aider au repliement de l'enzyme afin que celle-ci puisse augmenter son activité. Toutefois, pour que cette thérapie soit fonctionnelle, le patient doit présenter une activité enzymatique résiduelle. Cette thérapie pourrait être utilisée conjointement à la thérapie enzymatique de remplacement, mais est actuellement encore en phase clinique (Fan et Ishii, 2007; Parenti *et al.*, 2014). La thérapie par réduction de substrat, quant à elle, a pour objectif de diminuer

certaines étapes de la biosynthèse des métabolites non dégradés afin d'en diminuer l'accumulation. En d'autres termes, cette thérapie tente de rétablir un équilibre entre la synthèse de métabolites et la dégradation de ceux-ci (Platt et Jeyakumar, 2008; Schiffmann, 2010). Comme pour les chaperons, la thérapie par régulateurs de la protéostasie implique de petites molécules qui vont interagir avec le complexe de protéostasie, responsable de la régulation de la synthèse, du repliement, de l'agrégation, du transport et de la dégradation des protéines. Cette thérapie a principalement été développée pour traiter la maladie de Gaucher et la maladie de Tay-Sachs (Mu *et al.*, 2008).

Le projet le plus innovateur et prometteur quant au traitement des maladies lysosomales est celui de la thérapie génique. Le principe est d'injecter au patient une copie du gène codant pour la protéine déficiente à l'aide d'un vecteur viral. Idéalement, celui-ci s'intégrera au génome et l'enzyme sera continuellement produite, ce qui évitera aux patients de suivre un traitement périodique. Étant donné le caractère monogénique des maladies lysosomales, celles-ci sont d'excellentes candidates à la thérapie génique. Le but n'est pas nécessairement de ramener une activité enzymatique optimale chez le patient, mais une augmentation de seulement 10% peut être suffisante pour que le patient ne présente plus le phénotype caractéristique de la maladie (Parenti *et al.*, 2015). Certaines données précliniques effectuées chez les animaux et chez quelques patients sont encourageantes. Pour la leucodystrophie métachromatique, par exemple, un vecteur de lentivirus a permis le transfert du gène *ARSA* dans les cellules souches hématopoïétiques de trois patients ayant tous montré une augmentation de l'activité enzymatique ainsi qu'un arrêt de dégénérescence neuronale (Biffi *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2001). Des données plus récentes sur la thérapie génique de ce groupe de Milan montrent que près de 20 patients font maintenant partie de l'étude (MLD Foundation, 2015).

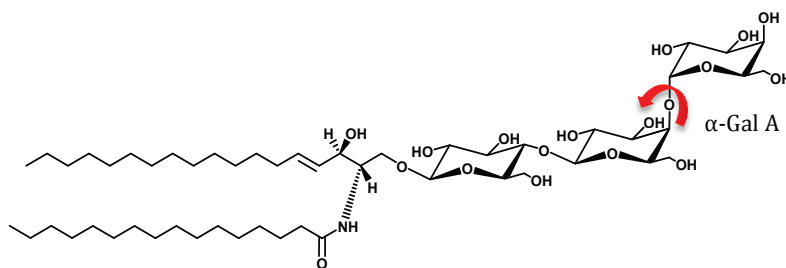
Pour traiter les symptômes cliniques, une équipe multidisciplinaire est nécessaire. Les traitements connexes les plus efficaces restent les greffes d'organes et les transplantations de cellules souches. La prise de traitements conjoints visent aussi à venir en aide aux complications neurologiques, respiratoires, cardiaques, gastro-intestinales, etc. (Parenti *et al.*, 2015).

1.3 La maladie de Fabry

1.3.1 Physiopathologie

La maladie de Fabry est une maladie génétique lysosomale multisystémique et panethnique liée à l’X. La grande variabilité de son expression phénotypique et génotypique en fait une maladie au cœur de la recherche actuelle. L’espérance de vie est d’environ 58 ans pour les hommes atteints et 75 ans pour les femmes porteuses (Clarke, 2007; MacDermot *et al.*, 2001). La maladie est causée par une mutation dans le gène *GLA*, situé sur le bras long du chromosome X, responsable de la transcription de la protéine alpha-galactosidase A. Cette protéine est impliquée dans le catabolisme des glycosphingolipides, en hydrolysant le lien entre les deux galactoses (voir Figure 3). Comme pour les autres maladies de surcharge, des manifestations systémiques sont observables lorsque ces molécules, non métabolisées et accumulées sous forme de vacuoles dans le lysosome, nuisent au fonctionnement cellulaire habituel (Clarke, 2007; Zampetti *et al.*, 2012).

Figure 3. Fonction de catalyse de l’enzyme alpha-galactosidase A sur un glycosphingolipide.



L’incidence de la maladie de Fabry est très variable, mais les spécialistes s’entendent pour dire qu’elle est sous-évaluée. Puisque la maladie est méconnue, avec une présentation variable et non caractéristique qui peut simuler plusieurs autres maladies, certains patients peuvent ne être jamais diagnostiqués. Au Canada, on parle d’environ un cas sur 40 000 naissances (Clarke, 2004). Toutefois, en Nouvelle-Écosse, un effet fondateur serait responsable d’une incidence plus élevée de la maladie, soit de 1 pour 10 000 naissances (West *et al.*, 2002).

Plus de 600 mutations du gène *GLA* ont été identifiées et sont responsables de l'apparition de la maladie (HGMD, 2014). Toutefois, certaines mutations sont plus importantes et néfastes que d'autres. Les mutations non-sens se situant au début dans la chaîne d'acides aminés, les mutations impliquant un mauvais repliement de l'enzyme, ou celles situées sur le site catalytique sont souvent plus lourdes de conséquences et mènent à des symptômes plus sévères chez le patient. Les hommes hémizygotes présentent des niveaux d'activité enzymatique relativement plus bas que celui des femmes hétérozygotes. Certaines femmes atteintes de la maladie de Fabry peuvent même avoir une activité enzymatique normale (Linthorst, 2005). Habituellement, les femmes présentent un tableau clinique plus tardif que celui des hommes (Gavin *et al.*, 2007), mais certaines femmes peuvent présenter des symptômes aussi sévères que ceux des hommes (Clarke, 2007; Germain, 2010).

La maladie peut se présenter sous deux formes: la forme classique et la forme tardive. La première est caractérisée par une apparition précoce de certains symptômes, incluant les angiokératomes et l'acroparesthésie, pour ensuite s'étendre au niveau des différents organes (Germain, 2010). Dans la seconde forme, les symptômes se développent plus tardivement et apparaissent au niveau d'organes cibles, comme le cœur ou les reins, mais avec un tableau clinique incomplet (Ries *et al.*, 2003; Smid *et al.*, 2015).

1.3.1 Signes et symptômes

1.3.1.1 Atteintes cardiaques

Les problèmes cardiaques sont l'une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les patients Fabry. Ceux-ci peuvent être observés autant chez les hommes hémizygotes que chez les femmes hétérozygotes. Il est rapporté que 5% des hommes et 12% des femmes atteints de la maladie de Fabry vont présenter seulement des symptômes cardiaques de la maladie. Certaines mutations, par exemple la mutation p.N215S, mèneront seulement à des symptômes cardiaques au patient. On dit alors que les patients présentent une variante cardiaque de la maladie (Chimenti *et al.*, 2004).

Les glycosphingolipides se retrouvent en quantité élevée dans plusieurs types de cellules cardiaques comme les cardiomyocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires. Les coupes histologiques montrent que l'endocarde et les tissus conducteurs, en plus du myocarde, sont atteints (Weidemann *et al.*, 2005). Une hypertrophie ventriculaire, principalement causée par une diminution du pouvoir de contractibilité, est l'un des principaux problèmes cardiaques observés chez les patients. Ils peuvent aussi présenter des dysfonctions endothéliales et une valvulopathie. L'accumulation de substrats peut aussi entraîner une occlusion des petites artérioles, ce qui a pour effet de mener, entre autres, à une intolérance à l'effort, de l'angine et des palpitations (Frustaci *et al.*, 2001; Yoshitama *et al.*, 2001). La maladie de Fabry est d'ailleurs une cause fréquente d'hypertrophie ventriculaire non diagnostiquée (Frustaci *et al.*, 2001; Yoshitama *et al.*, 2001).

1.3.1.2 Atteintes rénales

Les biopsies rénales ont montré que les atteintes aux reins commencent relativement tôt chez les patients Fabry, tout en étant asymptomatiques. Une grande proportion des enfants atteints, ainsi que la majorité des hommes et certaines femmes vont présenter une atteinte rénale (Germain, 2010). À long terme, les atteintes rénales ont pour conséquence l'apparition d'une protéinurie chez les patients (Mehta *et al.*, 2006). Il y a une diminution graduelle du débit de filtration glomérulaire et le développement de certaines anomalies tubulaires. Une augmentation de la taille des reins a aussi été observée, causée par l'infiltration lipidique de glycosphingolipides, suivie d'une diminution des reins lorsque les manifestations rénales deviennent plus sévères (Germain, 2000).

1.3.1.3 Atteintes dermatologiques

Il n'est pas anormal de voir quelques angiokératomes, se présentant sous forme de petites lésions cutanées rougeâtres d'environ 1-5 mm de diamètre, chez certaines personnes. Toutefois, lorsque ceux-ci sont diffus et nombreux, ils devraient être considérés comme symptomatiques et mener à une suspicion pour le diagnostic de la maladie de Fabry. Certes,

les angiokératomes peuvent aussi être une conséquence d'autres maladies lysosomales, comme la fucosidose et la bêta-mannosidose. Par ailleurs, les angiokératomes sont présents chez 66% des hommes et chez 36% des femmes Fabry (Orteu *et al.*, 2007). Chez les hommes, ils apparaissent habituellement tôt durant l'enfance sur les mains, les genoux, les flancs et les coudes. Les angiokératomes se font de plus en plus abondants à l'adolescence et à l'âge adulte et s'étendent au niveau des parties génitales, du nombril, des paumes des mains et des lèvres. Les hommes présentent habituellement plus de lésions que les femmes, qui en ont habituellement seulement sur le dos et l'abdomen (Zampetti *et al.*, 2012).

1.3.1.4 Atteintes neurologiques

Dès l'enfance, les patients peuvent présenter de l'acroparesthésie chronique, montrant une atteinte des fibres nerveuses en périphérie. Les atteintes au niveau du système nerveux autonome sont plus tardives et peuvent être fatales (Clarke, 2007). Chez les femmes porteuses comme chez les hommes atteints, il est commun d'observer des accidents cérébraux vasculaires et des lésions vasculaires ischémiques qui surviennent chez 25% des patients (Clarke, 2007). L'analyse par imagerie à résonance magnétique montre la présence de plusieurs lésions silencieuses au niveau des petites artères chez les patients qui augmentent avec l'âge (Clavelou et Besson, 2007).

1.3.1.5 Atteintes ophtalmologiques

Les manifestations ophtalmologiques sont les premières à être observables chez les patients Fabry, dès l'âge de 3 ans. Étant donné l'aspect précoce et la facilité d'observation de ces manifestations, celles-ci peuvent s'avérer très pertinentes pour le dépistage de la maladie (Michaud, 2013). Les patients peuvent présenter une opacité cornéenne, une cornée verticillée et des tortuosités au niveau de la paupière. Une étude effectuée à partir des données recueillies par le *Fabry Outcome Survey* montre que 77% des femmes et 73% des hommes Fabry présentent une cornée verticillée. Des tortuosités au niveau de la paupière ont pu être observées chez 22% des femmes et 49% des hommes. Des cataractes ont aussi

été répertoriées chez certains patients (10% des femmes et 23% des hommes) (Sodi *et al.*, 2007).

1.3.1.6 Atteintes psychologiques

L'anxiété, la démence, les psychoses et la dépression sont des symptômes pouvant être observés chez les patients Fabry. Des études ont démontré une incidence élevée de divorce, de suicide, d'alcoolisme et de chômage chez les hommes atteints (Crosbie *et al.*, 2009). L'incidence de la dépression est de 43% pour les patients Fabry, un pourcentage plus élevé que l'incidence dans la population non atteinte de la maladie de Fabry (Cole *et al.*, 2007).

1.3.1.7 Atteintes gastro-intestinales

Habituellement, les problèmes gastro-intestinaux sont précédés de plusieurs autres symptômes liés à la maladie, mais au final, 60% des patients y seront confrontés (Keshav, 2006). Les patients peuvent présenter des douleurs abdominales, des diarrhées, des nausées et des vomissements. Dans certains cas très rares, où les symptômes intestinaux sont trop importants, une colostomie peut être effectuée (Buda *et al.*, 2012).

1.4 Dépistage et diagnostic

1.4.1 Dépistage populationnel

L'intérêt d'implanter un dépistage populationnel pour les maladies lysosomales est de plus en plus répandu. Étant donné la disponibilité de traitements et la capacité de ceux-ci à améliorer grandement le pronostic des patients, le développement de dépistage populationnel pour ces maladies est jugé pertinent. La méthode utilisée pour le dépistage doit toutefois être validée et doit permettre de minimiser le diagnostic de faux-positifs et de faux-négatifs. Habituellement, des méthodes comme le dosage de l'activité enzymatique par spectrométrie de masse ou par fluorométrie, les essais immunologiques et la quantification de biomarqueurs par spectrométrie de masse sont utilisées (Gelb *et al.*, 2014). Plusieurs études montrent la validité d'utiliser la spectrométrie de masse à partir de sang

séché sur papier filtre comme méthode de dépistage, due à l'efficacité de cette technologie (Gelb *et al.*, 2014; Hwu *et al.*, 2009; Iemolo *et al.*, 2014). Au niveau de la maladie de Fabry, il est à noter que la quantification de biomarqueurs devrait être une méthode priorisée face au dosage de l'activité enzymatique pour les femmes, puisque le tiers de celles-ci ont une activité enzymatique normale et sont donc diagnostiquées comme étant des cas faux-négatifs (Linthorst *et al.*, 2005).

L'implantation de dépistage populationnel dans certains pays a aussi permis de mettre en évidence la sous-évaluation de l'incidence de la maladie de Fabry. À titre d'exemple, un dépistage néonatal effectué à Taipei, Taiwan sur plus de 170 000 nouveau-nés a montré que l'incidence de la maladie dans cette population est de 1 sur 1 250 naissances, avec une forte présentation de la mutation c.936+919G>A (variante tardive de la maladie de Fabry), ce qui permet de conclure à un effet fondateur dans cette population (Hwu *et al.*, 2009; Lin, 2009). Une autre étude, effectuée en Italie, a aussi mis de l'avant la présence d'un effet fondateur menant à une incidence de 1 sur 3 100 nouveau-nés (Spada *et al.*, 2006). Parmi les 12 cas dépistés, un cas présentait la forme classique de la maladie et les 11 autres nouveau-nés présentaient plutôt la forme tardive de la maladie.

1.4.2 Dépistage à haut risque

Le phénotype très variable d'un patient Fabry à l'autre ne permet pas toujours un diagnostic efficace à l'aide des manifestations cliniques; les patients Fabry ne présentent pas toujours tous les symptômes de la maladie et avec la même intensité. Toutefois, considérant que la prévalence de la maladie de Fabry dans certaines populations cibles est notable, un dépistage à haut risque dans ces populations est une solution efficace et intermédiaire au dépistage populationnel, qui est plus coûteux et fastidieux (Desnick *et al.*, 2003; Desnick et Brady, 2004; Meikle *et al.*, 1999; Ramaswami *et al.*, 2012). Un protocole de dépistage à haut risque utilisant le dosage urinaire du Gb₃ normalisé à la créatinine par spectrométrie de masse en tandem, grâce à un spécimen d'urine déposé sur un papier filtre, a d'ailleurs récemment permis le dépistage de patients présentant des anomalies ophtalmologiques (Auray-Blais *et al.*, 2009; Michaud et Auray-Blais, 2012).

Les dépistages à haut risque ciblent habituellement les patients ayant des manifestations rénales (sous dialyse ou ayant subi une greffe rénale) et/ou avec des problèmes cardiaques (hypertrophie ventriculaire gauche) et/ou ayant subi un ou plusieurs accidents vasculaires cérébraux et/ou présentant certaines particularités ophtalmologiques. Dans tous les cas, aucune cause connue pouvant expliquer les symptômes ne doit avoir été trouvée, permettant la suspicion de la maladie de Fabry. Des études ont montré que 0.33% des hommes et 0.10% des femmes sous dialyse présentaient la maladie de Fabry (Linthorst *et al.*, 2010). Aussi, 0.38% des hommes ayant eu recours à une transplantation rénale en seraient atteints (Linthorst *et al.*, 2010). Aucune femme ayant reçu une transplantation rénale et pour laquelle aucune cause pathologique n'est connue n'a été dépistée (Linthorst *et al.*, 2010). La prévalence de la maladie de Fabry chez les patients avec hypertrophie ventriculaire gauche est de 3.9% chez les hommes et 11.8% chez les femmes (Linthorst *et al.*, 2010). Pour les patients ayant subi des accidents vasculaires cérébraux, la prévalence est de 4.2% chez les hommes et 2.1% chez les femmes (Linthorst *et al.*, 2005). Le Tableau 2 montre d'autres exemples de dépistages à haut risque de la maladie de Fabry effectués dans certains pays ainsi que leur prévalence respective.

Tableau 2. Prévalence de la maladie de Fabry dans certaines populations à risque.

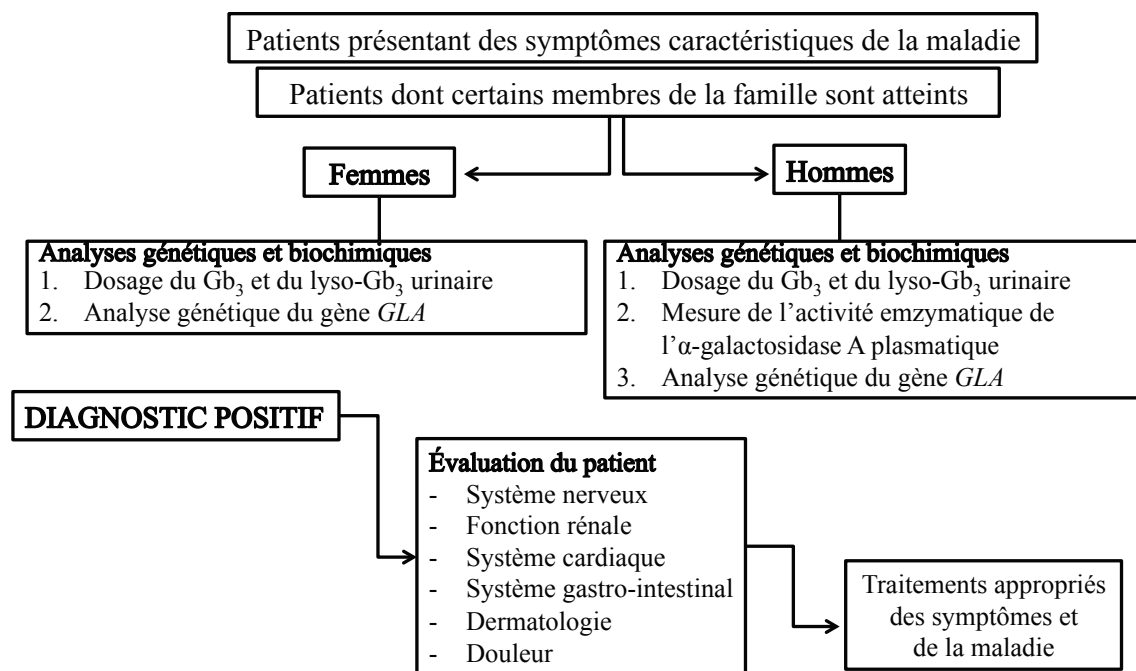
Dépistage à haut risque	Lieu	Prévalence (%)
Patients sous dialyse (Linthorst <i>et al.</i> , 2003)	Pays-Bas	0.22
Hommes sous dialyse (Nakao <i>et al.</i> , 2003)	Japon	1.2
Hommes avec hypertrophie ventriculaire gauche (Sachdev <i>et al.</i> , 2002)	Angleterre	3.0
Patients avec cardiomyopathie hypertrophique tardive (Nakao <i>et al.</i> , 1995)	Japon	6.0 (Hommes) 12.0 (Femmes)
Patients avec cardiomyopathie hypertrophique tardive (Chimenti <i>et al.</i> , 2004)	Italie	6.0 (Hommes) 12.0 (Femmes)
Patients ayant eut un accident cérébrovasculaire d'origine inconnue (Rofls <i>et al.</i> , 2005)	Allemagne	4.9 (Hommes) 2.4 (Femmes)

1.4.3 Diagnostic

Étant donné la grande variabilité phénotypique, il a été estimé qu'entre le début des symptômes et le diagnostic de la maladie, il fallait en moyenne 14 ans pour diagnostiquer

les hommes et 16 ans pour les femmes (Mehta et Winchester, 2012). Ce délai n'aide en rien au pronostic des patients. Toutefois, les avancées en recherche, la sensibilisation auprès des médecins à être plus attentifs aux symptômes et l'implantation de cliniques de dépistage permet d'améliorer la détection de la maladie plus tôt.

Figure 4. Déroulement du dépistage et du diagnostic de la maladie de Fabry.



Un diagnostic sera effectué chez un patient chez qui il y a suspicion de la maladie, soit par la présentation de symptômes cliniques ou parce que certains membres de la famille ont été diagnostiqués comme atteints ou porteurs d'une mutation. Comme montrées dans la Figure 4, les étapes du diagnostic diffèrent chez les femmes et les hommes (Auray-Blais et al., 2009). Chez les hommes, le dosage des biomarqueurs spécifiques (Gb₃ et lyso-Gb₃) de la maladie sera effectué, suivie de la mesure de l'activité enzymatique, ainsi que de l'analyse mutationnelle du gène *GLA*. Puisque le tiers des femmes présente une activité enzymatique normale, l'étape du dosage enzymatique n'est pas effectuée chez ces dernières. Lorsque le diagnostic est posé, une évaluation clinique complète du patient est effectuée afin de permettre une prise en charge des différents symptômes causés par la maladie (Clarke, 2007). Même si cette pratique n'est pas répandue pour la maladie de Fabry, il est aussi

possible d'effectuer un diagnostic prénatal en mesurant l'activité enzymatique ou à l'aide de tests d'ADN à partir de cellules amniotiques (Germain, 2000).

1.4.4 Conseil génétique

Le conseil génétique est le processus par lequel des patients atteints d'une maladie génétique seront conseillés, suivis et soutenus par un professionnel de la santé, soit le conseiller en génétique et le médecin généticien. Ces derniers seront aussi responsables de les informer sur les caractéristiques de leur maladie, de leur expliquer le mode de transmission, les symptômes pouvant survenir et les traitements disponibles pour eux et les membres de leur famille. Étant donné la grande variabilité de la présentation de la maladie de Fabry d'un patient à l'autre, le conseil génétique est important, mais peut s'avérer complexe (Read et Donnai, 2009).

1.5 Traitements pour la maladie de Fabry

1.5.1 Thérapie enzymatique de remplacement

Actuellement, deux thérapies enzymatiques de remplacement sont disponibles pour traiter la maladie de Fabry. L'agalsidase alfa (Replagal®, Shire Human Genetic Therapies) et l'agalsidase beta (Fabrazyme®, Genzyme Corporation, une Division Sanofi) (Sirrs *et al.*, 2010; Sirrs *et al.*, 2014). L'agalsidase beta est toutefois le seul traitement approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis. Tous deux sont des dérivés de l'enzyme déficiente chez les patients Fabry, l'alpha-galactosidase A humaine. La structure de la chaîne primaire est la même, mais la structure des chaînes secondaires d'oligosaccharides est modifiée. L'agalsidase beta comporte un nombre plus important de résidus mannose-6-phosphate, dont le rôle est de permettre aux protéines recombinantes d'être introduites dans la cellule. Dans les deux cas, la thérapie est donnée par voie intraveineuse aux deux semaines (Clarke, 2007). La dose administrée n'est toutefois pas la même pour les deux produits: 0,2 mg/kg de poids corporel d'agalsidase alfa est infusé aux patients comparativement à 1,0 mg/kg de poids corporel pour l'agalsidase beta. L'agalsidase alfa est produite à partir d'une lignée de fibroblastes cutanés, tandis que

l'agalsidase beta est produite à l'aide de cellules d'ovaires de hamster chinois (Clarke, 2007). Les coûts annuels pour le traitement par thérapie enzymatique de remplacement varient entre 250 000\$ à 300 000\$ canadiens (CAD) pour un patient adulte (Desnick *et al.*, 2003). Les deux protéines recombinantes sont sensiblement équivalentes. Plusieurs études ont montré que pour les deux thérapies, le niveau de glycosphingolipides diminue considérablement dans le sang et l'urine de la majorité des patients, menant à une diminution des symptômes cliniques (Germain, 2010). Malgré la prise de la TER, il arrive que certains patients subissent des arrêts cérébrovasculaires, causés par les dommages irréversibles aux organes présents avant le début de la thérapie (Wilcox *et al.*, 2004). Le développement d'anticorps contre les protéines recombinantes peut limiter l'utilisation de la thérapie chez certains patients (Eng *et al.*, 2001; Schiffmann *et al.*, 2001; Schiffmann *et al.*, 2015).

1.5.2 Thérapie génique

La thérapie génique est un traitement des plus prometteurs pour la maladie de Fabry. Le principe revient à fournir au patient le gène dysfonctionnel afin que celui-ci puisse lui-même produire l'enzyme alpha-galactosidase A. En théorie seulement quelques cellules, pour lesquelles un vecteur viral contenant le gène fonctionnel serait intégré, seraient suffisantes pour que le nombre de métabolites accumulés diminue de façon importante (Capotondo *et al.*, 2007). Des études ont montré qu'il y avait bel et bien une correction de la déficience enzymatique lorsque les cellules transfectées étaient ajoutées à des cellules hématopoïétiques de patients Fabry (Qin *et al.*, 2001). Les études précliniques sont encourageantes et montrent, chez les souris, une bonne réponse à la thérapie, une correction de l'activité enzymatique et une diminution marquée du niveau de glycosphingolipides (Takenaka *et al.*, 2000). Actuellement, la thérapie génique est au stade préclinique dans le cadre d'un projet de recherche canadien, dirigé par le professeur Jeffrey A. Medin. (Auray-Blais *et al.*, 2013).

1.5.3 Thérapies complémentaires

La perte d'activité enzymatique de l'alpha-galactosidase A peut être due à un mauvais repliement de celle-ci. Lorsqu'elles sont mal repliées, ces protéines sont amenées à être dégradées par le réticulum endoplasmique. La thérapie par chaperons vise à modifier la conformation anormale de l'enzyme afin que celle-ci devienne active. Il a été observé que pour la maladie de Fabry, un grand nombre de mutations faux-sens menait à un mauvais repliement de l'enzyme produite, d'où l'utilisation potentielle de chaperons comme traitement. Cette thérapie est actuellement en essai clinique (Fan et Ishii, 2007). La thérapie par réduction de substrat est aussi en essai clinique pour la maladie de Fabry. Celle-ci permettrait de rétablir l'homéostasie protéique en diminuant la quantité de composés accumulés (Laney *et al.*, 2013). Finalement, les traitements connexes offerts aux patients permettent d'amoindrir les symptômes et les conséquences de la maladie. Ceux-ci peuvent avoir recours à des greffes rénales, à des analgésiques et à des médicaments spécifiques pour aider aux problèmes cardiaques, neurologiques et intestinaux (Futerman et van Meer, 2004).

1.6. Les biomarqueurs en santé

1.6.1 Définition

Par définition, un biomarqueur est un indicateur important de changement qui reflète la présence ou l'absence d'une activité biologique spécifique. Celui-ci se doit d'être mesurable ou observable et peut être un métabolite, une protéine, une substance chimique ou un processus visible (Cox, 2006).

Dans le domaine clinique, les biomarqueurs sont utilisés comme outils de diagnostic et de dépistage. Ils permettent, entre autres, d'évaluer la sévérité d'une maladie et d'établir le pronostic d'un patient. Lorsque la concentration du biomarqueur corrèle avec la sévérité de la maladie, il est possible d'évaluer la progression de celle-ci chez le patient, mais aussi d'évaluer si la prise d'un traitement permet d'améliorer la condition de celui-ci. La nécessité d'utiliser des biomarqueurs pour le suivi des patients est donc indispensable. En

recherche, les biomarqueurs permettent d'évaluer l'effet de certaines thérapies sur le métabolisme, d'étudier les corrélations entre le phénotype et le génotype des patients et aident à mieux comprendre la physiopathologie de certaines maladies et leurs mécanismes biochimiques (Pesce et Kaplan, 1984). Les dosages immunologiques et enzymatiques, les méthodes colorimétriques et les méthodes chromatographiques sont parmi les méthodes couramment utilisées en laboratoire pour la quantification de biomarqueurs. De plus en plus, la spectrométrie de masse en tandem est utilisée et est implantée dans les laboratoires de biochimie clinique des hôpitaux. La sensibilité, la rapidité et la robustesse qu'offre la spectrométrie de masse font d'elle une technologie de choix (Khamis *et al.*, 2015).

1.6.2 Caractéristiques d'un biomarqueur idéal

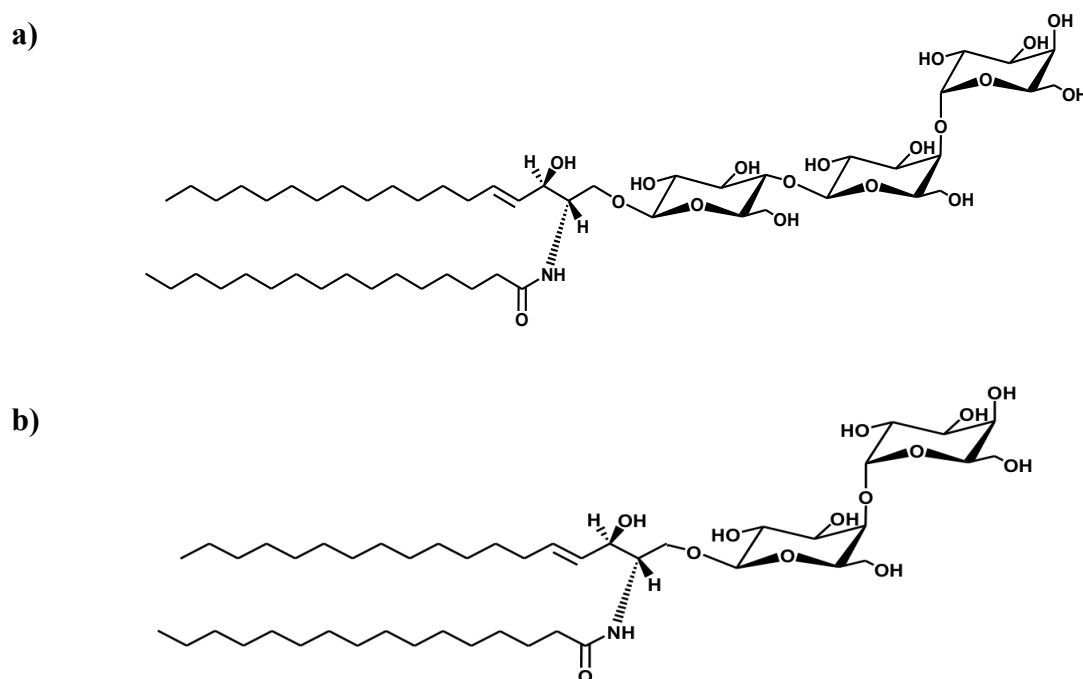
Un biomarqueur doit présenter certaines caractéristiques pour que son utilisation soit envisageable dans le domaine clinique : 1) celui-ci doit être facilement mesurable dans les liquides biologiques. En effet, lorsque possibles, les méthodes non invasives sont priorisées aux méthodes invasives, puisque ces dernières comportent davantage de risques pour le patient; 2) le biomarqueur doit être spécifique à la maladie pour laquelle il est utilisé et, si possible, sa concentration doit corrélérer avec la sévérité de celle-ci; 3) le biomarqueur doit être peu ou pas présent chez les contrôles sains et ce, afin d'éviter le dépistage accidentel d'un nombre important de faux-positifs; 4) la molécule choisie doit être stable afin de permettre sa quantification sans qu'il y ait de dégradation, ce qui pourrait mener à un biais des valeurs obtenues; finalement, 5) les biomarqueurs pour lesquels le dosage est rapide et peu dispendieux sont priorisés (Burtis *et al.*, 2008).

1.6.3 Biomarqueurs pour la maladie de Fabry

Grâce à plusieurs dizaines d'années de recherche, on compte aujourd'hui plus d'une soixantaine de biomarqueurs pour la maladie de Fabry. La grande majorité sont des analogues ou isoformes des principaux substrats accumulés, le Gb₃ et le lyso-Gb₃ (Auray-Blais et Boutin, 2012; Auray-Blais et Boutin, 2015).

C'est en 1898 que deux médecins, ont simultanément décrit la maladie de Fabry en observant certaines manifestations cliniques, principalement d'ordre dermatologique, chez plusieurs patients. C'est toutefois beaucoup plus tard que l'implication du lysosome dans la pathologie a été identifiée. Dans les années 1960, les tissus rénaux d'un homme atteint de la maladie de Fabry ont montré la présence d'une accumulation lipidique (Sweeley et Klionsky, 1963). Deux glycosphingolipides ont alors été identifiés comme anormalement accumulés: le globotriaosylcéramide (Gb₃) et le galabiosylcéramide (Ga₂), ce dernier étant présent en plus faible concentration (Figure 5). Par contre, étant donné qu'il est retrouvé en grande concentration, le Gb₃ fut utilisé de façon prioritaire pour la recherche sur la maladie. Ce biomarqueur est non seulement anormalement élevé dans les tissus de la majorité des patients présentant la forme classique de la maladie, mais aussi dans les liquides biologiques, tels au niveau urinaire et sanguin. Sa présence dans les liquides biologiques a permis la mise en place de méthodes de dépistage non invasives de la maladie de Fabry (Auray-Blais *et al.*, 2008; Kitagawa *et al.*, 2005).

Figure 5. **a)** Structure chimique du globotriaosylcéramide (Gb₃); et **b)** Structure chimique du galabiosylcéramide (Ga₂).



Une étude a été effectuée en 2005 dans le but d'évaluer la pertinence du Gb₃ comme biomarqueur pour la maladie de Fabry (Young *et al.*, 2005). Le Gb₃ urinaire et plasmatique a été évalué chez plus de 80 patients atteints de la maladie de Fabry, dont 40 hommes hémizygotés et 21 contrôles sains. Des niveaux élevés de Gb₃ ont été trouvés chez 31 hommes Fabry. Neuf patients, dont 6 patients portant la mutation à variante cardiaque p.N215S ont montré des niveaux plasmatiques de Gb₃ normaux. Au niveau urinaire, 3 de ceux-ci ont montré des niveaux élevés de Gb₃ seulement. Les niveaux de Gb₃ ont aussi été évalués chez des patients avant et après la prise d'une TER afin de voir si le traitement mène à une diminution du niveau d'excrétion du biomarqueur, et donc si celui-ci peut permettre l'évaluation de la réponse au traitement des patients. Il a été montré que pour les patients montrant des niveaux initiaux de Gb₃ très élevés, ceux-ci sont fortement diminués suite à la prise de la TER. Les résultats sont toutefois moins concluants lorsque les patients présentent des niveaux de Gb₃ pré-thérapie moins élevés (principalement les femmes). L'étude conclut que l'utilisation du Gb₃ comme biomarqueur comporte certaines limites, bien que sa quantification, dans l'urine principalement, soit révélatrice et utile (Mills *et al.*, 2005; Whitfield *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2005). Certaines limitations viennent aussi du fait que bien que la concentration du Gb₃ corrèle avec le sexe et le type de mutations des patients, elle ne corrèle pas avec l'âge des patients et les manifestations cliniques (Auray-Blais *et al.*, 2008).

C'est en 2008 qu'un nouveau biomarqueur a été identifié dans le plasma des patients Fabry, soit le globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) (Aerts *et al.*, 2008). Cette molécule diffère du Gb₃ par l'absence de la chaîne d'acide gras, donc elle a subi une déacylation. L'étude montre aussi la corrélation existant entre la concentration de lyso-Gb₃ et le traitement par TER chez les patients. La présence de ce biomarqueur dans l'urine des patients Fabry a par la suite été identifiée par spectrométrie de masse en tandem, permettant l'utilisation de méthodes non invasives par la collecte urinaire et l'analyse de ce biomarqueur chez les patients (Auray-Blais *et al.*, 2010). Des analogues du lyso-Gb₃, caractérisés par des modifications dans la partie sphingosine de la molécule, ont été identifiés suite à deux études métabolomiques par spectrométrie de masse en temps de vol dans l'urine (Auray-Blais *et al.*, 2012) et dans le plasma (Dupont *et al.*, 2013). La Figure 6 et le Tableau 3

montrent respectivement la structure chimique du lyso-Gb₃ ainsi que les modifications sur la sphingosine à l'origine des 7 analogues de la molécule. Des recherches subséquentes ont permis d'effectuer des corrélations entre l'excrétion du lyso-Gb₃ urinaire et de ses analogues avec le sexe des patients et la thérapie enzymatique de remplacement (Lavoie *et al.*, 2013). La concentration urinaire des analogues du lyso-Gb₃ montre une corrélation avec certaines manifestations cardiaques de la maladie pour les patients présentant une mutation à variante cardiaque, telle la mutation p.N215S. Une autre étude a montré des niveaux anormaux des analogues du lyso-Gb₃ chez des patients portant cette mutation, pour lesquels les niveaux de Gb₃ étaient normaux (Auray-Blais *et al.*, 2014).

Figure 6. Structure chimique du globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃).

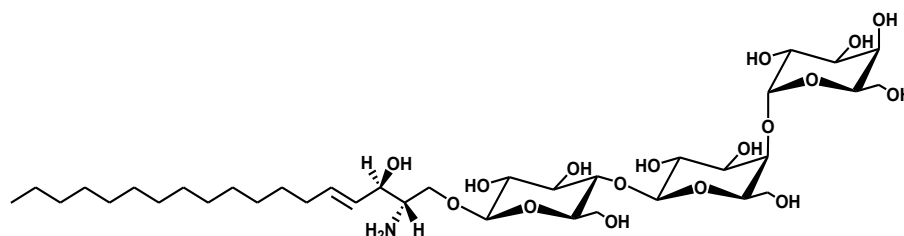


Tableau 3. Modification sur la sphingosine des analogues du globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) et leur masse respective (m/z).

Lyso-Gb ₃ et ses analogues	Masse (amu)	Δ avec lyso-Gb ₃ (amu)	Modification (formule empirique)
Lyso-Gb ₃	786	n/a	n/a
Lyso-Gb ₃ (-28)	758	-28	-C ₂ H ₄
Lyso-Gb ₃ (-12)	774	-12	-C ₂ H ₄ +O
Lyso-Gb ₃ (-2)	784	-2	-H ₂
Lyso-Gb ₃ (+14)	800	+14	-H ₂ +O
Lyso-Gb ₃ (+16)	803	+16	+O
Lyso-Gb ₃ (+34)	820	+34	+H ₂ O ₂
Lyso-Gb ₃ (+50)	836	+50	+H ₂ O ₃

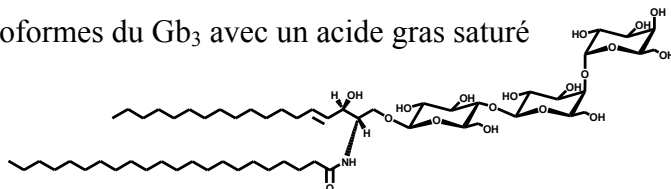
Dans le but de pouvoir étudier davantage les corrélations entre les manifestations cliniques, mais aussi pour bonifier le dépistage de la maladie de Fabry, une étude métabolomique a été effectuée, visant à identifier des analogues et des isoformes du Gb₃ dans l'urine (Auray-Blais et Boutin, 2012) et dans le plasma (Manwaring *et al.*, 2013) de patients Fabry. Au niveau urinaire, 5 nouveaux groupes de biomarqueurs ont pu être identifiés et sont représentés dans la Figure 7: a) les isoformes avec un acide gras saturé; b) les isoformes et

analogues avec un lien double supplémentaire; c) les analogues avec une sphingosine hydratée; d) les isoformes avec deux liens doubles supplémentaires et finalement; e) les isoformes comportant une méthylation. La pertinence de l'ajout de ses isoformes aux analyses actuelles et les corrélations avec les manifestations cliniques demeurent importantes à étudier. Certes, certaines études de fragmentation en spectrométrie de masse ont montré le rôle potentiel d'intermédiaire métabolique des isoformes méthylés du Gb₃ (Auray-Blais et Boutin, 2012). Cette hypothèse sera discutée dans la Section 1.9.1.

Dernièrement, une étude métabolomique visant à détecter et à identifier la présence d'analogues et d'isoformes du Ga₂ a été effectuée. Au total, 22 isoformes et analogues ont été quantifiés dans l'urine des patients Fabry, ceux-ci étant tous retrouvés en faible quantité chez les contrôles sains. Les rapports entre les isoformes similaires (comportant la même modification au niveau de la sphingosine ou de l'acide gras) du Ga₂ et du Gb₃ montrent que bien qu'en général, le Gb₃ soit retrouvé en plus grande concentration que le Ga₂, l'isoforme de Ga₂ ayant un acide gras hydroxylé montre des niveaux beaucoup plus élevés que le Gb₃ ayant la même modification. Cette découverte permet de présumer que différentes voies biochimiques sont sans doute impliquées dans le métabolisme de synthèse et/ou de catabolisme de ces deux glycosphingolipides (Boutin et Auray-Blais, 2015). Bien que les glycosphingolipides soient les principaux biomarqueurs utilisés pour le dépistage et le suivi de la maladie de Fabry, une étude a récemment mis de l'avant, par spectrométrie de masse en utilisant des approches protéomiques, la spécificité de certaines molécules plasmatiques appartenant à d'autres classes de molécules pour les patients atteints de la maladie de Fabry (Hollander *et al.* 2015).

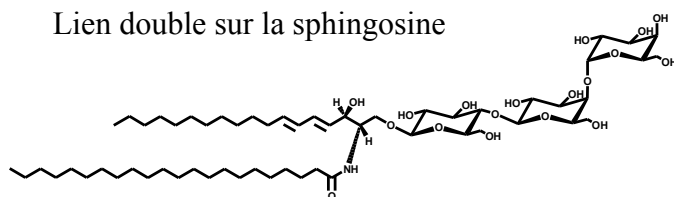
Figure 7. Structures des isoformes et analogues du Gb₃ déterminés par des études de fragmentation en utilisant le spectromètre de masse en temps de vol.

a) Isoformes du Gb₃ avec un acide gras saturé

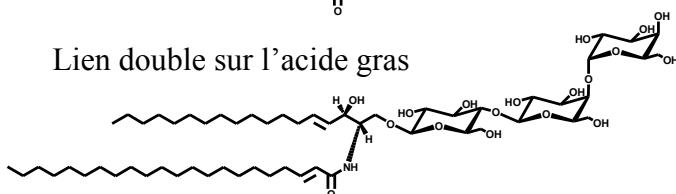


b) Analogues/isoformes du Gb₃ avec un lien double supplémentaire

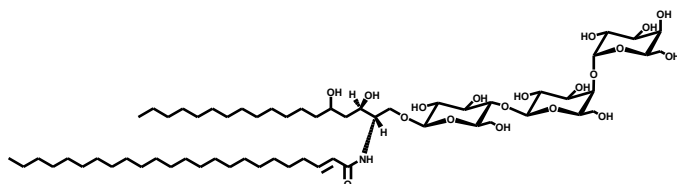
Lien double sur la sphingosine



Lien double sur l'acide gras

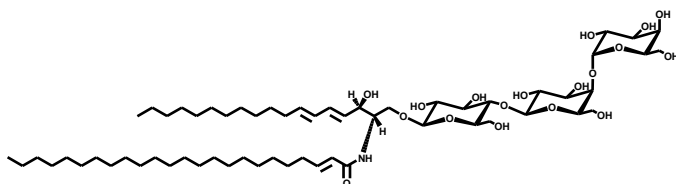


c) Analogues du Gb₃ avec une sphingosine hydratée

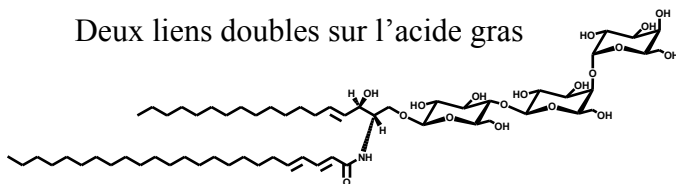


d) Analogues/isoformes du Gb₃ avec deux liens doubles supplémentaires

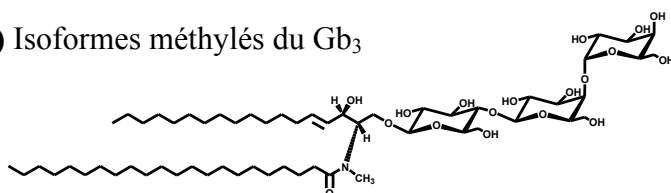
Un lien double sur la sphingosine et un lien double sur l'acide gras



Deux liens doubles sur l'acide gras



e) Isoformes méthylés du Gb₃



1.7 La spectrométrie de masse en tandem

1.7.1 Historique de la spectrométrie de masse

C'est en 1919 que Joseph John Thomson, récipiendaire du prix Nobel de physique en 1906 et du prix Nobel de la chimie en 1922, développe le premier spectromètre de masse qui permet de découvrir l'existence des isotopes pour les éléments non radioactifs. La contribution de plusieurs chercheurs a permis l'avancement de cette technologie par le développement de l'analyse en temps de vol en 1946, l'analyse par quadripôles en 1953 et l'invention du GC/MS en 1956. La spectrométrie de masse en tandem a été développée en 1967 et a subi de nombreuses modifications et optimisations au cours des dernières décennies. Le Tableau 4 présente les principaux avancements en spectrométrie de masse du dernier siècle (Siuzdak, 2006).

Tableau 4. Éléments historiques de la spectrométrie de masse.

Années	Découvertes	Chercheurs
1912	Développement du premier spectromètre de masse	Thomson
1919	Mesure des isotopes des éléments	Aston et Thomson
1946	Analyse en temps de vol	Stephens
1953	Analyse par quadripôles	Paul et Steinwedel
1956	Développement du GC/MS	Gohlke et McLafferty
1959	Identification de séquences peptidiques	Biemann et <i>al.</i>
1966	Ionisation chimique	Munson et Field
1967	Développement de la spectrométrie de masse en tandem	McLafferty et Jennings
1968	Ionisation par électronébulisation (ESI)	Dole et <i>al.</i>
1973	LC-MS	McLafferty
1978	Triple quadripôle	Yost et Enke
1984	Électronébulisation de macromolécules/micromolécules	Fenn
1987	Développement du MALDI	Tanaka et <i>al.</i>
1993	Identification de protéines	Henzel et <i>al.</i>

1.7.2 Principes de base et composantes d'un spectromètre de masse

Un spectromètre de masse est un outil analytique de fine technologie qui permet la détection, l'identification, la caractérisation de structures chimiques et la quantification de molécules d'intérêt selon leur rapport masse sur charge (m/z). Le principe de base revient à générer et à séparer les molécules chargées (ions) selon ledit rapport m/z en phase gazeuse (Shrader, 2014).

Le domaine d'application de la spectrométrie de masse est très vaste. Il est possible d'identifier la composition atomique ou moléculaire d'un échantillon, mais aussi d'obtenir des informations structurales d'une molécule en fragmentant celle-ci et en analysant les fragments obtenus. Cette technologie est utilisée dans plusieurs domaines, dont entre autres, au niveau pharmaceutique, en clinique, en environnement et en recherche. Elle permet de vérifier la pureté de certains matériaux, de détecter la présence de drogues et de stéroïdes chez les athlètes, d'identifier les polluants dans l'environnement et les pesticides alimentaires (Hoffmann et Stroobant, 2002). Dans le domaine médical, la spectrométrie de masse est de plus en plus utilisée. Même si l'acquisition d'un appareil demeure un investissement important, la spécificité, la haute résolution et la rapidité d'analyse sont très avantageuses. Les principales utilisations en clinique relèvent de l'identification et de la quantification de protéines et de métabolites, du dépistage et du diagnostic de maladies métaboliques héréditaires, du monitoring et du suivi du traitement des patients à court et à long terme et de la découverte de nouveaux biomarqueurs pour plusieurs maladies.

La Figure 8 montre l'appareil utilisé lors de la présente étude, soit un spectromètre de masse en tandem Xevo-TQS (Waters Corporation) couplé à un système de chromatographie en phase liquide à ultra performance ACQUITY UPLC I-Class (Waters).

Les spectromètres de masse comportent plusieurs composantes de base, représentées dans la Figure 9. L'entrée de l'échantillon se fait habituellement par chromatographie. Les échantillons sont donc préalablement séparés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), chromatographie liquide en ultra haute performance (UPLC) ou

chromatographie en phase gazeuse (GC), ce qui permet une certaine purification préalable et une sélection des molécules qui pourront passer dans le spectromètre de masse. Les échantillons se retrouvent habituellement sous forme liquide ou gazeuse, mais l'utilisation d'une source MALDI ("Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice") permet aussi l'analyse d'échantillons solides (Shrader, 2014). Il est aussi possible d'infuser directement l'échantillon dans le spectromètre de masse. Cette méthode est utilisée lorsque la pureté de l'échantillon est élevée ou lors du développement de méthodes (Watson et Sparkman, 2007).

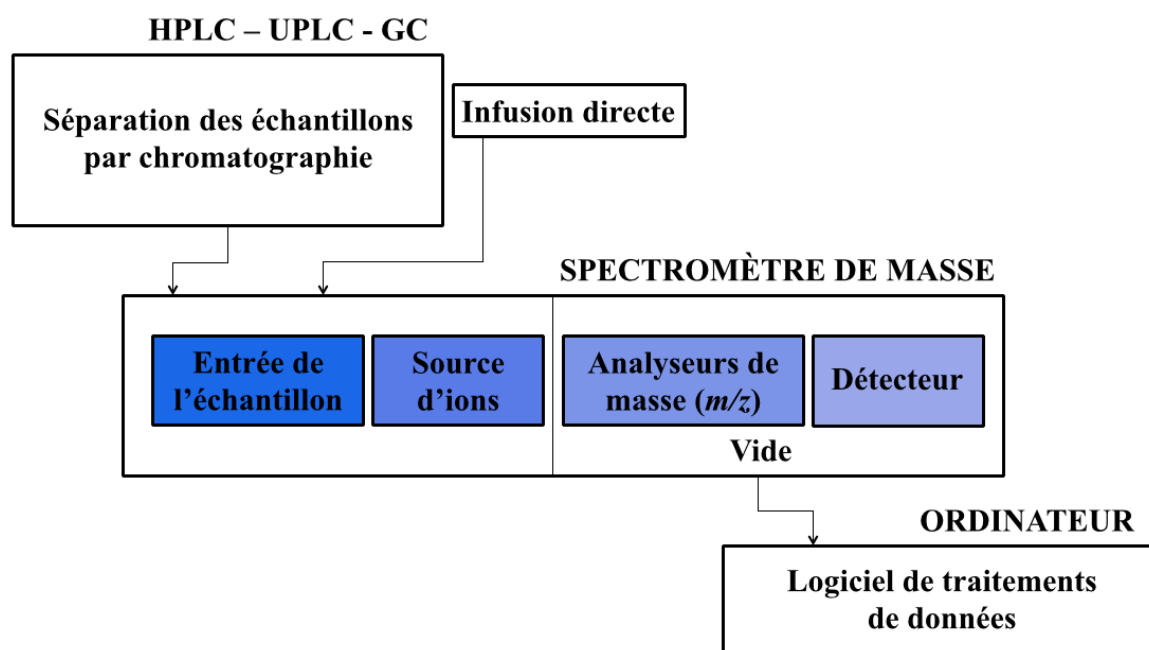
Figure 8. Spectromètre de masse en tandem Xevo-TQS (à droite) couplé à un système de chromatographie en phase liquide à ultra performance ACQUITY UPLC I-Class (à gauche).



Lorsque l'échantillon est introduit dans le spectromètre de masse, les molécules sont ionisées. Plusieurs sources d'ionisation peuvent être utilisées. Il faut alors choisir la plus adéquate selon la méthode à développer. Les principales sources d'ionisation actuelles sont l'ionisation électronique (IE), l'ionisation chimique (IC), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB), la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et finalement, l'ionisation par électroébulisaison (ESI, soit "electrospray ionization"), soit celle utilisée dans le cadre de cette étude. Une fois les molécules ionisées, celles-ci pourront passer dans l'analyseur, responsable de la séparation des ions en fonction de leur rapport m/z . Les principaux types

d'analyseurs habituellement utilisés sont l'analyseur en temps de vol, l'analyseur de type trappe ionique, l'analyseur à secteur magnétique, l'analyseur orbitrap, l'analyseur à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) et l'analyseur quadripolaire, utilisé dans cette étude. Les ions ayant le rapport m/z sélectionné et donc isolés et séparés par l'analyseur, seront dirigés vers le détecteur, où il y aura transformation en signal électrique des ions transmis. Le signal est proportionnel à l'abondance ionique. Les résultats sont alors traités et transmis à l'aide d'un logiciel informatique. Afin d'éviter toute perturbation de l'action du champ de force magnétique ou électrique qui dirige des ions de la source jusqu'au détecteur, le vide est maintenu dans le spectromètre de masse à l'aide de pompes turbomoléculaires (Gross et SpringerLink, 2011).

Figure 9. Schéma illustrant les composantes de base d'un spectromètre de masse.

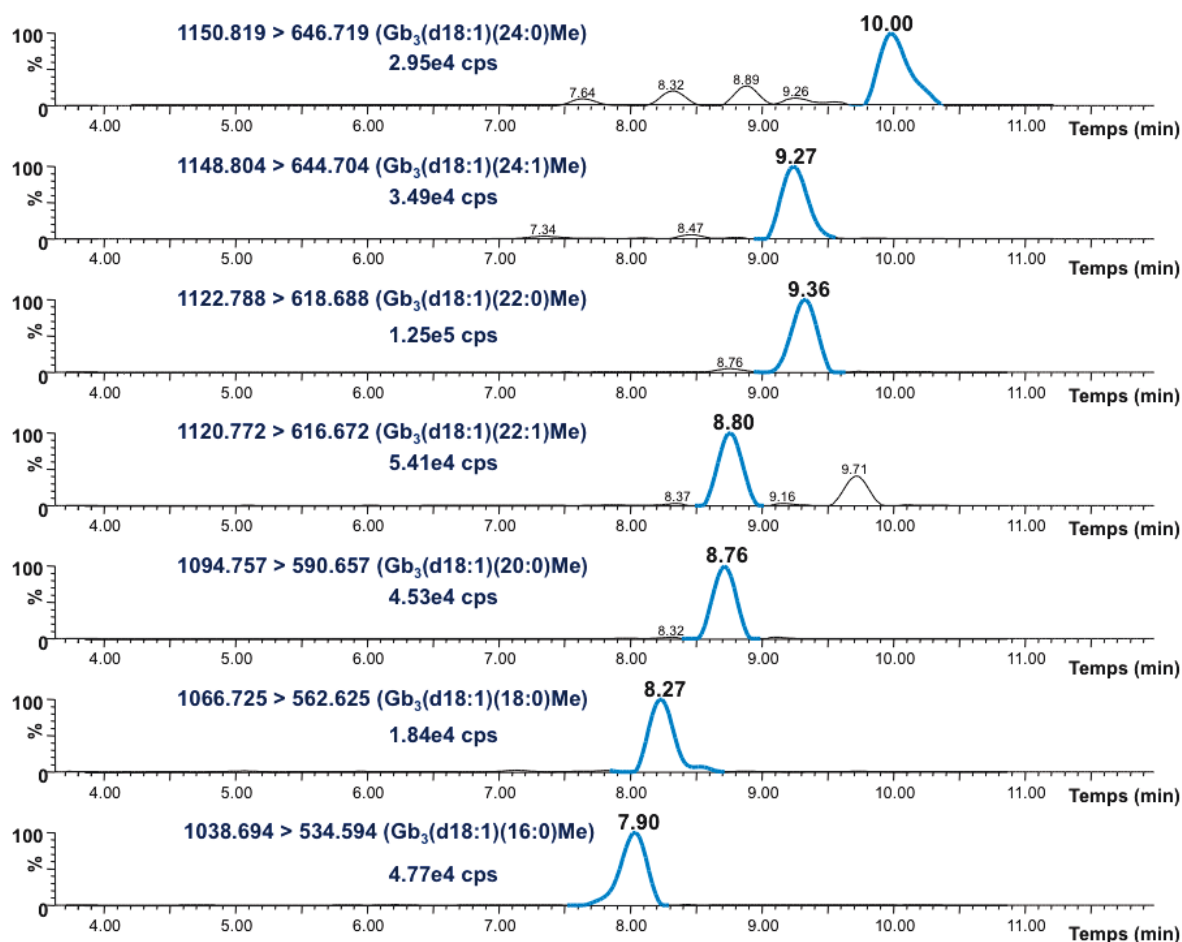


1.7.3 Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide ultra-performante

La chromatographie liquide en ultra-performance est une technologie mise en place en 2004 par la compagnie Waters qui se base sur les mêmes principes que l'HPLC, mais à

quelques différences près. La différence relève principalement de la grosseur des particules de la phase stationnaire de la colonne, qui est de beaucoup réduite par rapport à l'HPLC, ce qui permet une augmentation substantielle de la pression dans celle-ci. Cette modification permet un gain majeur de la résolution chromatographique, de la vitesse d'analyse ainsi que de la sensibilité. Afin de simplifier le passage d'HPLC à UPLC, la compagnie Waters offre dans sa plateforme informatique une application permettant d'entrer les paramètres actuels de la méthode HPLC utilisée et d'en calculer l'équivalence en UPLC. La Figure 10 montre des chromatogrammes urinaires des 7 isoformes méthylés du Gb₃ suite à l'injection dans le UPLC-Xevo TQ-S d'un échantillon urinaire provenant d'un patient adulte Fabry non traité. Chacune des molécules a un temps de rétention qui lui est propre.

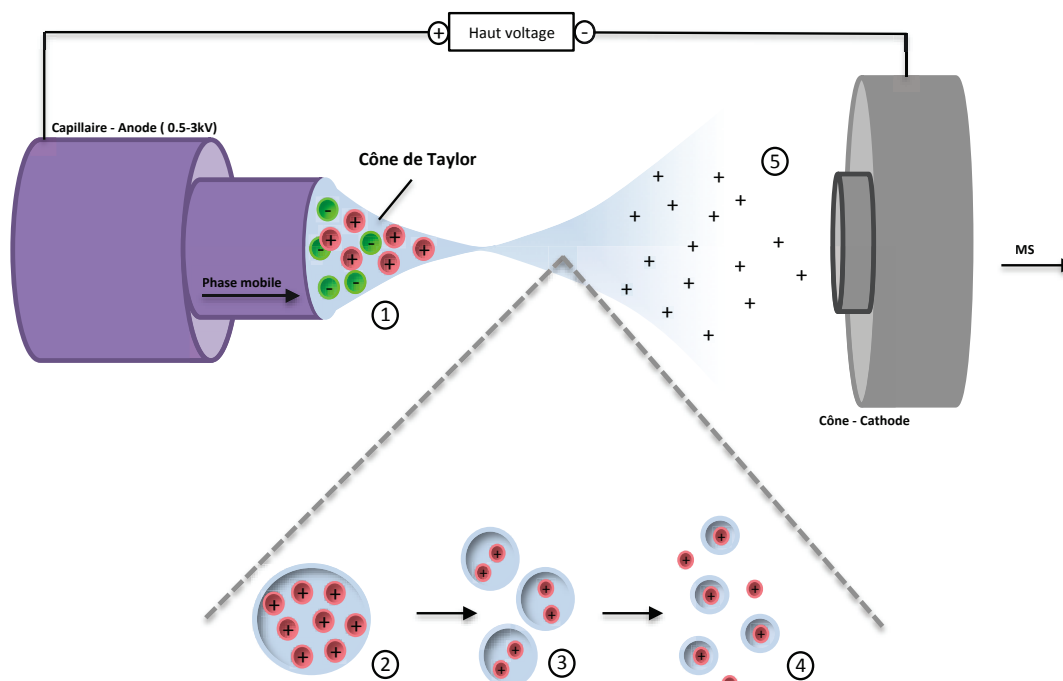
Figure 10. Exemple d'un chromatogramme obtenu pour les 7 isoformes méthylés du Gb₃ suite à l'analyse urinaire d'un patient non traité atteint de la maladie de Fabry.



1.7.4 Électronébulisation

L'électronébulisation est l'une des méthodes d'ionisation dite douce couramment utilisée. Elle se produit directement dans l'enceinte de la source. Son principe est simple : les molécules de l'échantillon sont amenées à passer à travers un capillaire sur lequel un courant spécifique est appliqué, choisi en fonction de la charge des molécules que l'on veut laisser passer vers l'analyseur.

Figure 11. Principe de l'électronébulisation en mode positif.



En ce qui concerne ce projet et les isoformes méthylés du Gb₃ qui sont chargés positivement, la charge appliquée sur le capillaire sera positive, afin que la répulsion entre celui-ci et les molécules les amènent à l'extrémité du capillaire. L'application d'une différence de potentiel élevée, entre le capillaire (l'anode dans ce cas-ci) et le cône (la cathode dans ce cas-ci), permet la création d'un champ électrique, guidant les molécules chargées à travers l'appareil. Ce champ électrique, lorsqu'il est suffisamment fort, permet la création de ce que l'on appelle un cône de Taylor à la sortie du capillaire, menant à la formation de petites gouttelettes ayant une densité de charge élevée, comme le montre sur

la Figure 11. Le champ électrique requis pour permettre l'électronébulisation est donné par l'équation suivante:

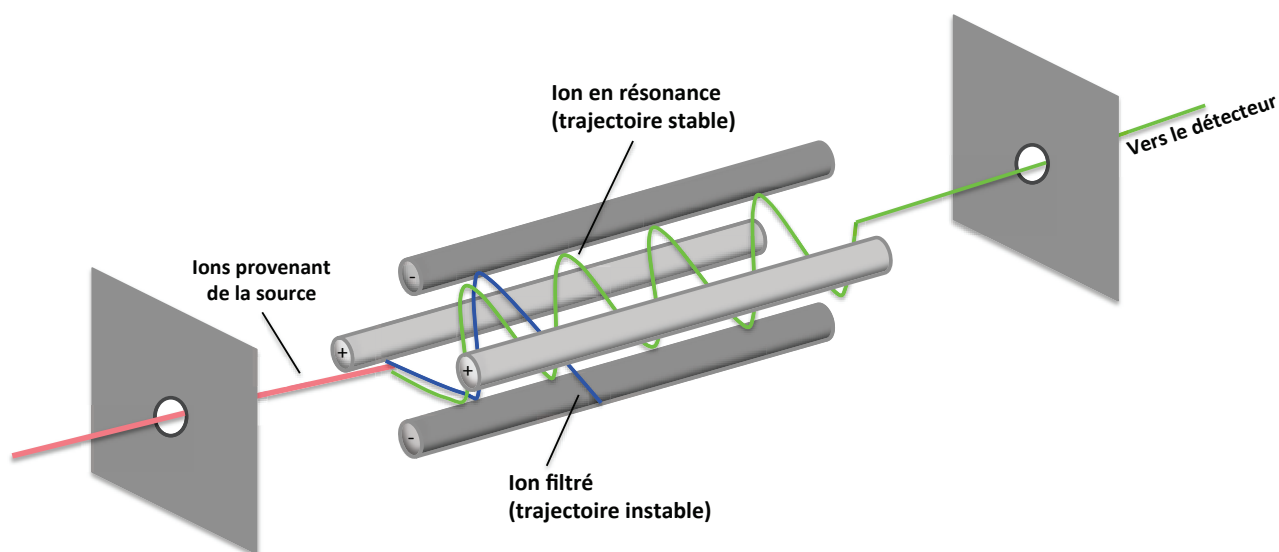
$$E_0 = \left(\frac{2\gamma \cos 49^\circ}{\epsilon_0 r_c} \right)^{\frac{1}{2}}$$

où E_0 est le champ électrique, γ la tension de surface, ϵ_0 est la permittivité du vide et r_c le rayon du capillaire utilisé (Kearle, 2000). Les molécules seront menées vers la chambre d'évaporation, dans laquelle la température est très élevée et où il y a présence d'un gaz nébulisant. L'application d'un voltage permet aux gouttelettes de poursuivre leur trajectoire vers l'analyseur. Étant donné la densité de charge élevée des gouttelettes et la force coulombique entre les particules chargées d'une même gouttelette, celles-ci vont se diviser de façon à devenir de plus en plus petites, jusqu'à ce que le solvant soit complètement évaporé et que les molécules chargées se retrouvent en suspension et puissent se rendre vers l'analyseur (Hoffmann et Stroobant, 2002).

1.7.5 Analyseur quadripolaire

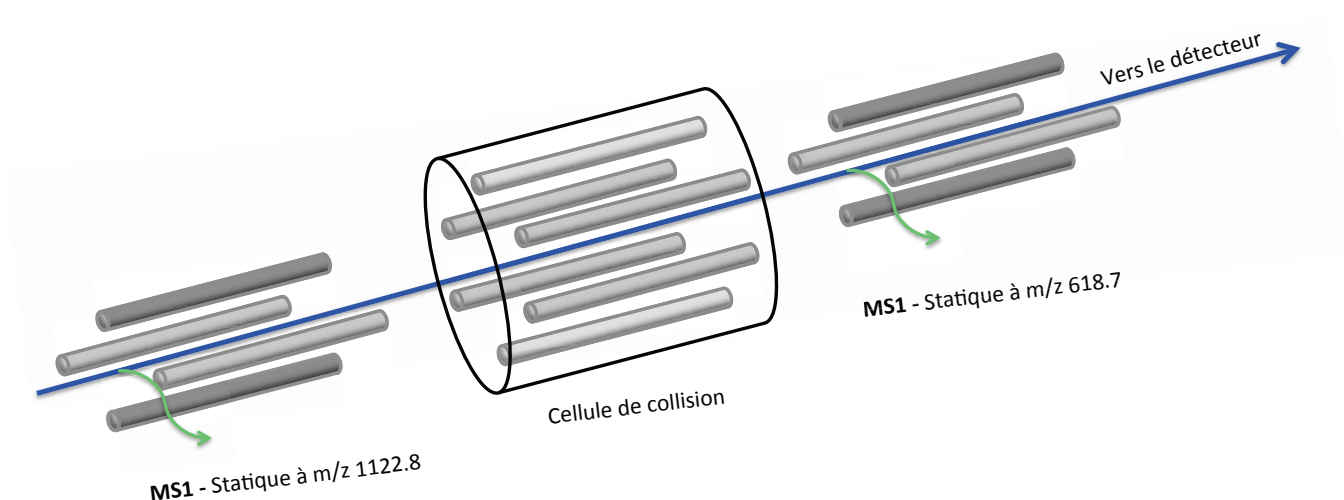
Un quadripôle est constitué de quatre tiges pairées soumises au même potentiel, mais opposé. Le principe revient à appliquer des tensions sur les tiges, afin de permettre une trajectoire stable pour les molécules selon le rapport m/z sélectionné. Les molécules n'ayant pas le rapport m/z sélectionné au préalable ne se rendront donc pas jusqu'au détecteur (voir Figure 12) (Shrader, 2014).

Figure 12. Principe d'un quadripôle.



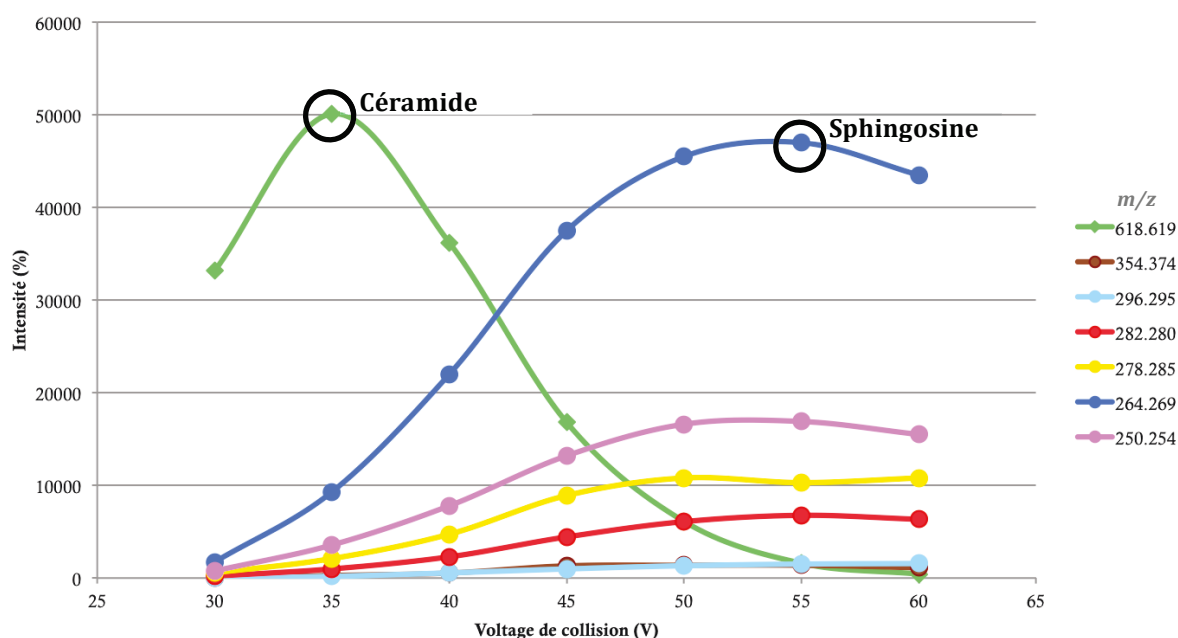
Afin de permettre une plus grande sélectivité, deux quadripôles séparés par une chambre à collision sont utilisés en spectrométrie de masse en tandem. Cette méthodologie permet une double sélection d'un rapport m/z . Tel que montré à la Figure 13, le premier analyseur permet la sélection de la molécule à quantifier. Celle-ci se dirige ensuite vers une cellule à collision dans laquelle un flux de gaz, comme l'argon, mène à la fragmentation des molécules, dits fragments de l'ion précurseur. Ces ions fragments sont caractéristiques de la molécule-mère et eux seuls seront quantifiés. Le deuxième analyseur sera donc optimisé pour laisser passer seulement les molécules ayant le rapport m/z correspondant à la molécule à quantifier.

Figure 13. Composantes de l'analyseur d'un spectromètre de masse en tandem.



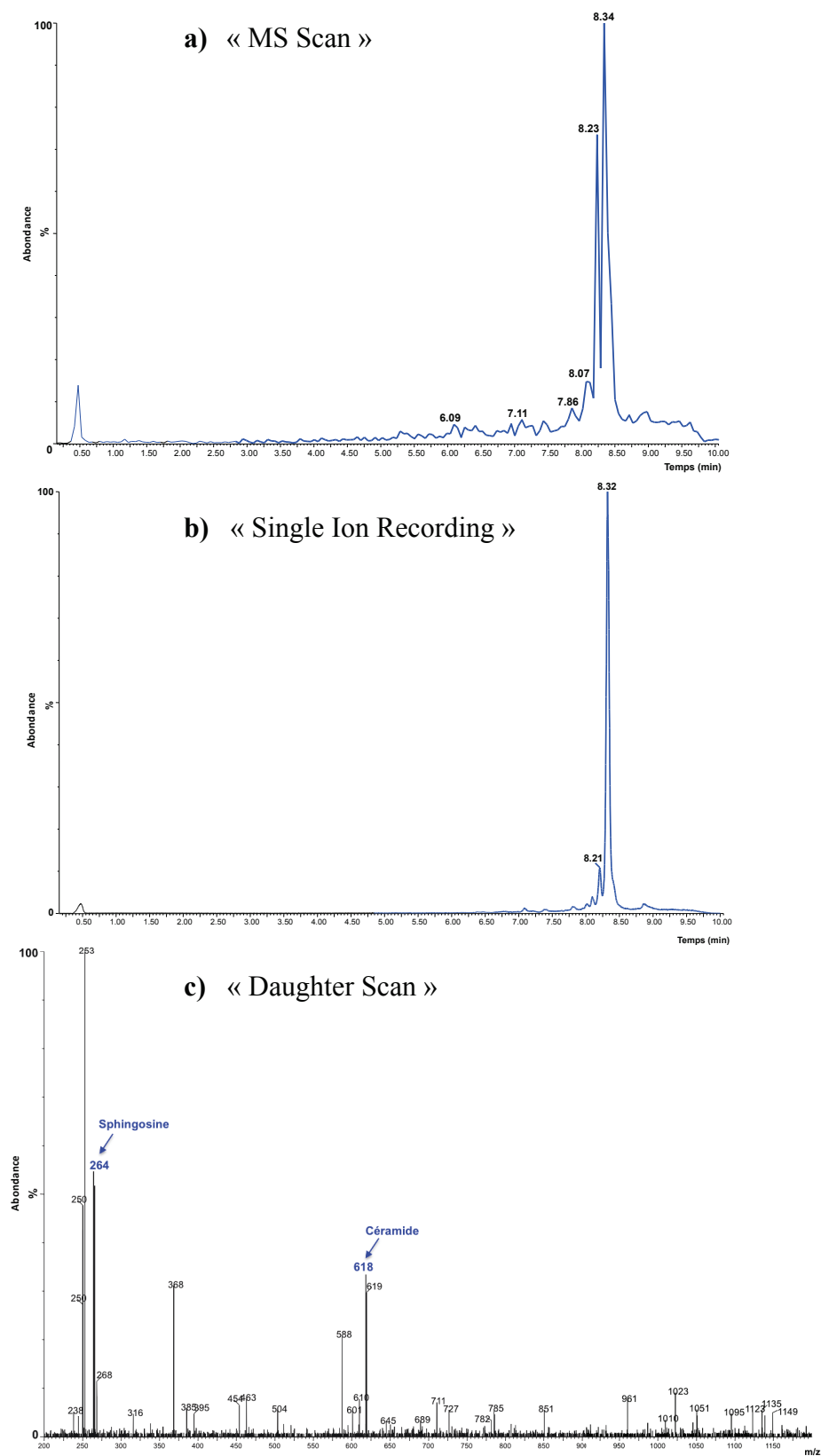
Il est possible d'identifier l'ion fragment à utiliser en analysant le mécanisme et le spectre de fragmentation de la molécule à l'étude. Le spectre et le mécanisme de fragmentation pour les isoformes méthylés du Gb₃ ont d'ailleurs fait l'objet d'une étude effectuée précédemment dans notre laboratoire (Auray-Blais et Boutin, 2012). En fonction du voltage de collision appliqué dans la cellule à collision, une molécule donnée pourra fragmenter de manière différente. Il est donc possible de choisir un voltage de collision qui permet d'avantager un certain ion fragment. Afin d'évaluer, en laboratoire, quel ion fragment comporte le meilleur potentiel d'analyse, il suffit de faire varier le voltage de collision et d'analyser l'intensité du signal obtenu pour les différents ions fragments sous évaluation. La Figure 16 montre cette variation du voltage de collision pour le Gb₃(d18:1)(C22:0)Me et présente les résultats obtenus lors de l'analyse de 7 fragments de la molécule mère du Gb₃(d18:1)(C22:0)Me. Le fragment à m/z 618.619, représente le groupement céramide de la molécule mère et celui à m/z 264.269 représente le groupement sphingosine de la molécule mère, qui sont les plus prometteurs, dus à la forte intensité du signal obtenu.

Figure 14. Intensité du signal obtenu par rapport au voltage de collision pour 7 ions fragments de la molécule mère de Gb₃(d18:1)(C22:0)Me.



En plus du MRM, d'autres modes d'acquisition peuvent être utilisés afin d'étudier les molécules et d'optimiser le développement de la méthode. La Figure 17 montre différents modes utilisés lors de cette étude. Le mode « MS Scan » (a) permet d'effectuer un balayage pour une plage de rapports m/z donnés (seul le premier quadripôle est fonctionnel). Ce mode permet principalement d'identifier les molécules contenues dans l'échantillon comportant le même rapport m/z que la molécule analysée, leur sensibilité et leur abondance relative. Le mode « Single Ion Recording » (b) permet la sélection d'un rapport m/z précis (ici, m/z 1122 qui est caractéristique de l'isoforme Gb₃(d18 :1)(C22 :0)Me). Seul le premier quadripôle est optimisé. La cellule à collision et le deuxième quadripôle guident simplement les ions jusqu'au détecteur. Finalement, le mode « Daughter Scan » (c) implique l'utilisation du deuxième quadripôle. Le premier quadripôle est mis en mode statique et permet seulement le passage de la molécule d'intérêt. Les ions sont ensuite fragmentés dans la cellule à collision et passe par la suite dans le deuxième quadripôle, où un balayage d'une plage de rapports m/z des ions fragments produits est effectué. Ce mode peut être utile pour aider à la sélection de l'ion fragment à utiliser.

Figure 15. Spectres obtenus pour l'isoforme Gb₃(d18 :1)(C22 :0)Me en a) « MS Scan », en b) « Single Ion Recording » et en c) « Daughter Scan ».



1.8 Développement et validation d'une méthode en spectrométrie de masse en tandem

1.8.1 Principes du développement et d'optimisation d'une méthode par spectrométrie de masse

Le développement d'une méthode par spectrométrie de masse est un travail laborieux et exigeant. Il requiert une bonne connaissance de la chimie analytique, du domaine d'application choisi, ainsi que des composantes physiques du spectromètre de masse.

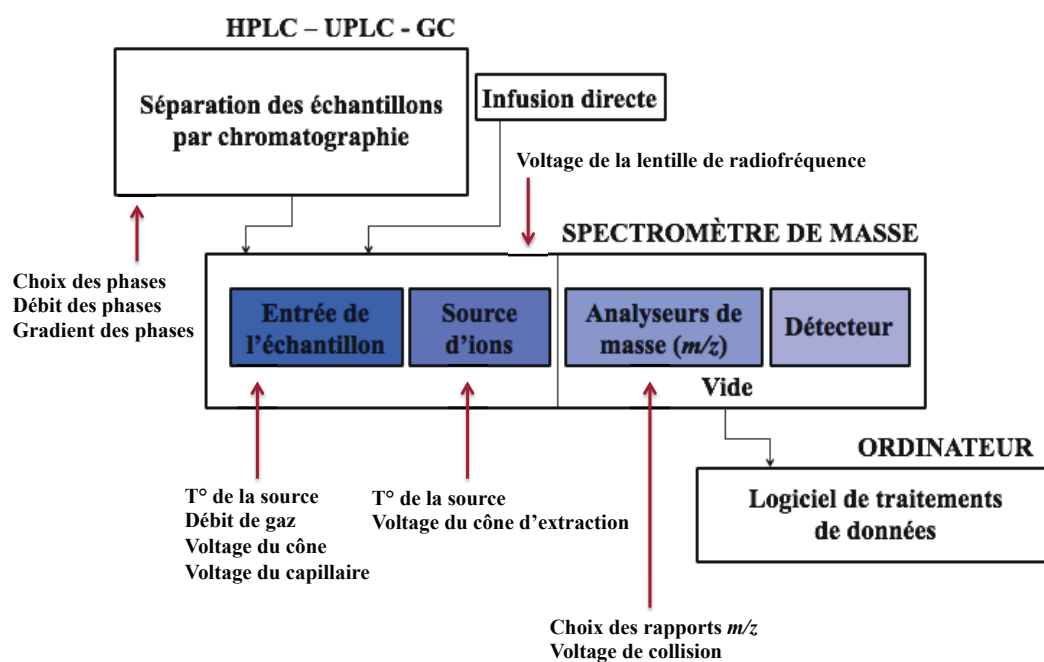
Le développement d'une méthode peut se diviser en 5 grandes étapes : 1) le choix de la matrice, des molécules à quantifier et du processus de normalisation; 2) l'optimisation des paramètres du spectromètre de masse; 3) le développement et l'optimisation des paramètres de la chromatographie liquide; 4) le développement et l'optimisation de la méthode d'extraction de l'échantillon à analyser; et 5) la validation analytique.

Avant de débiter le développement de la méthode, il est important de choisir certains paramètres initiaux. Premièrement, quelles sont les molécules à doser? Sont-elles ionisables? Quelle est la structure de la molécule et à partir de quelle matrice seront-elles extraites? L'urine est une matrice très privilégiée puisqu'elle requiert un processus de collecte de l'échantillon qui est non invasif pour le patient. Toutefois, la quantification de certaines molécules ne peut pas toujours être effectuée au niveau urinaire. Le sang (complet, plasma ou sérum) ou le liquide céphalo-rachidien peuvent aussi être nécessaires dans certains cas, par exemple pour le dosage de certains neurotransmetteurs ou de protéines spécifiques. Il est important de vérifier sous quelle forme se trouve la molécule à quantifier et si son extraction peut se faire en ne compromettant pas la stabilité de celle-ci. La quantification de certaines molécules nécessite parfois une normalisation du résultat. La concentration de certains métabolites de l'urine par exemple, est très variable d'un patient à l'autre, mais aussi pour un même patient au cours de la journée (variation diurne). Afin d'éviter tout biais possible lors de l'analyse de différentes molécules, il faut donc tenir compte de la normalisation en utilisant un biomarqueur représentatif pour la quantification de biomarqueurs dans les liquides biologiques. La créatinine urinaire est une molécule de choix pour la normalisation lorsque l'urine est utilisée en vue d'une quantification. Les

études ont montré qu'elle reflète adéquatement la concentration urinaire des patients, même chez ceux présentant des problèmes rénaux (Mills *et al.*, 2005; Whitfield *et al.*, 2005). De plus, c'est une molécule stable, simple à extraire et facilement quantifiable en laboratoire. La sphingomyéline et la phosphatidylcholine peuvent être aussi utilisées pour la normalisation urinaire (Auray-Blais *et al.*, 2009). Au niveau plasmatique, la normalisation des biomarqueurs lors d'une quantification se fait souvent en terme de volume de sang utilisé.

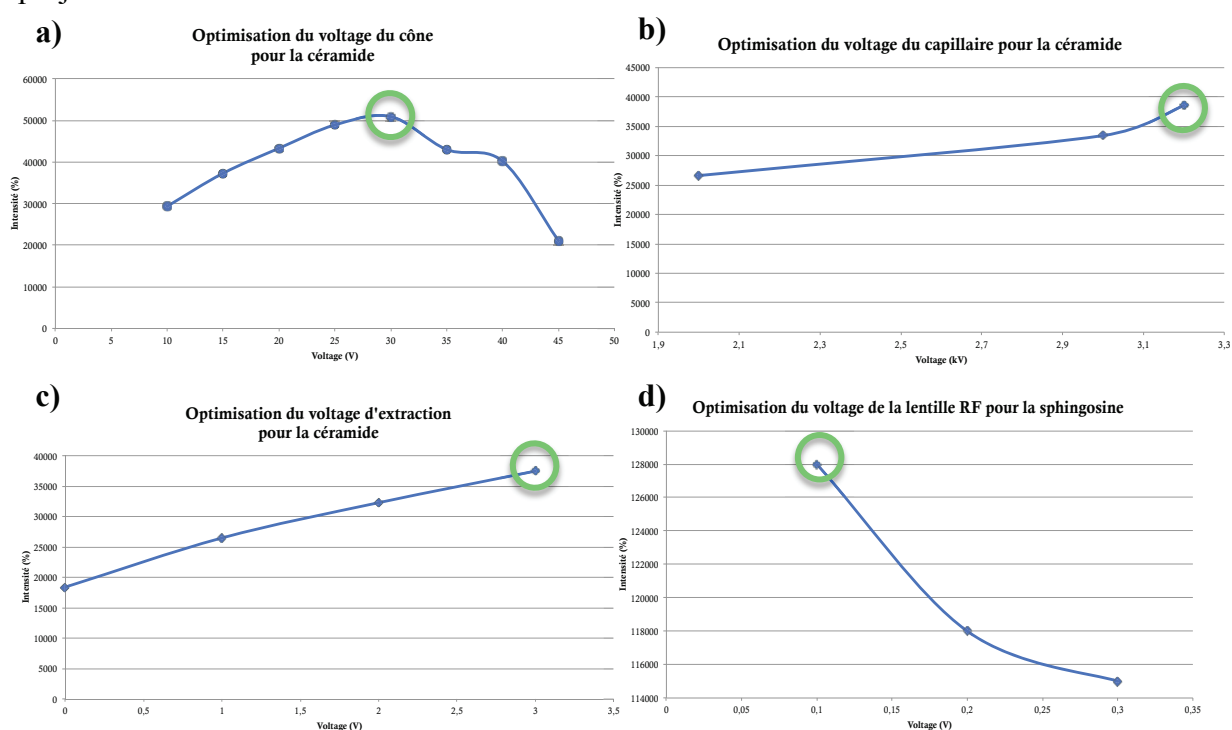
Dans cette étude, la matrice utilisée est l'urine et la molécule choisie pour la normalisation est la créatinine. L'un des buts de cette étude était de procéder à l'analyse de la créatinine simultanément avec celle des biomarqueurs visés lors d'une même injection. Il est à noter que lorsqu'une analyse indépendante est nécessaire pour quantifier la créatinine, ceci mène à un accroissement du temps d'analyse et nécessite une préparation supplémentaire de l'échantillon. Cette partie du développement de la méthode sera discutée à la Section 1.8.3.

Figure 16. Principaux paramètres optimisés lors du développement d'une méthode.



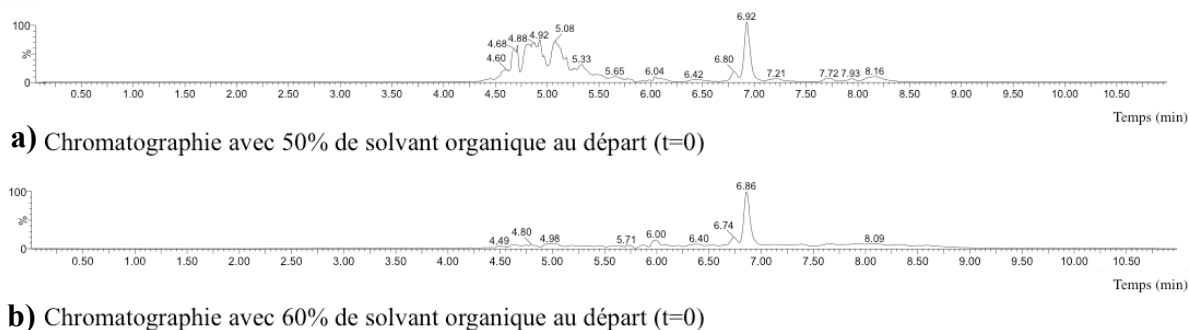
Lorsque les molécules à doser et la matrice utilisée sont choisies, il est possible de commencer le développement de la méthode en choisissant le type de spectromètre de masse qui sera utilisé et en optimisant les paramètres de celui-ci. Le principe revient à faire varier chacun des paramètres individuellement afin d'évaluer quelle combinaison permet d'augmenter le signal de la molécule d'intérêt, tout en désavantageant les contaminants présents dans la matrice (Gross et SpringerLink, 2011). La Figure 18 montre un schéma des différents paramètres pouvant être optimisés au niveau des composantes du spectromètre de masse. Par ailleurs, la Figure 19 présente des graphiques de l'intensité du signal obtenu en fonction du voltage pour certains paramètres optimisés sur le spectromètre de masse en tandem, tels le voltage du cône, le voltage du capillaire et le voltage d'extraction pour la céramide, de même que le voltage de la lentille d'extraction (« RF lens ») pour la sphingosine lors du développement de la méthode développée dans ce projet de recherche.

Figure 17. Graphiques montrant l'intensité du signal obtenu en fonction du voltage pour certains paramètres optimisés sur le spectromètre de masse en tandem Xevo TQ-S lors du développement de la méthode à partir de l'isoforme Gb₃(d18 :1)(C22 :0)Me: **a)** l'optimisation du voltage du cône pour la céramide; **b)** l'optimisation du voltage du capillaire pour la céramide; **c)** l'optimisation du voltage d'extraction pour la céramide; et **d)** l'optimisation du voltage de la lentille RF pour la sphingosine. Le cercle vert représente l'intensité maximale et donc le voltage sélectionné pour la méthode développée dans ce projet.



Lorsque les paramètres initiaux du spectromètre de masse sont choisis, il est possible de commencer le développement de la chromatographie liquide. Dépendamment de la nature des molécules à extraire, une colonne efficace devra être choisie. Une multitude de colonnes sont disponibles commercialement et permettent la rétention de composés spécifiques. Il est pertinent de faire l'essai de plusieurs colonnes afin d'évaluer laquelle permet l'obtention optimale de la chromatographie et l'élimination du plus grand nombre de contaminants. La structure et les caractéristiques chimiques des molécules à l'étude doivent être prises en considération pour cette étape. Par exemple, pour les isoformes méthylés du Gb₃, il est possible d'utiliser des colonnes qui retiennent les chaînes de carbone. Il est important de choisir les phases mobiles à utiliser, le pH des solutions, ainsi que le gradient optimal de phases. La Figure 20 montre une nette amélioration de la chromatographie lorsqu'il y a une augmentation de 10% de la phase organique (voir en b). Ceci mène à une diminution du bruit de fond sur le chromatogramme et permet de purifier le pic correspondant au biomarqueur de l'étude.

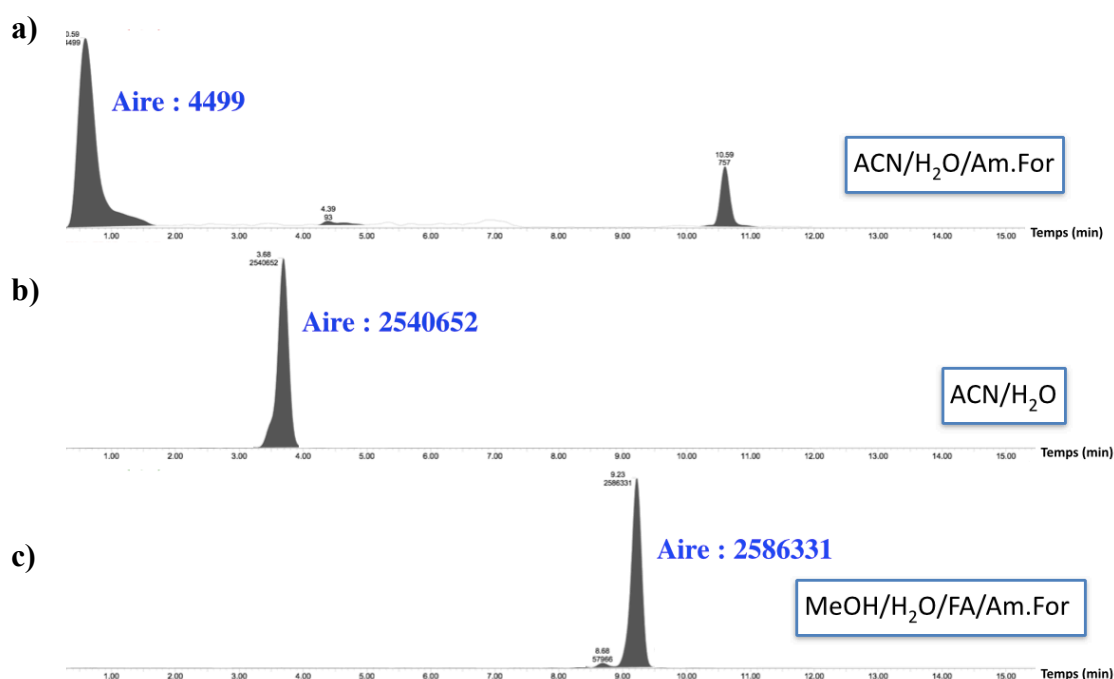
Figure 18. Impact du gradient de phases mobiles sur la chromatographie démontré par deux exemples où la quantité de solvant organique a été augmentée de 10%, soit de **a)** 50% à **b)** 60%. Le bruit de fond diminue considérablement lorsqu'il y a une augmentation de la quantité de solvant organique dans la phase mobile.



La Figure 21 montre trois chromatogrammes pour lesquels différents solvants ont été testés. Afin d'évaluer laquelle des combinaisons de solvants permet d'obtenir la plus haute résolution chromatographique et une meilleure retenue des molécules d'intérêts (les isoformes méthylés et non-méthylés du Gb₃, dans ce cas-ci) sur la colonne, il est possible de regarder le profil de la chromatographie, ainsi que l'aire sous la courbe des différents

pics obtenus. Dans ce cas-ci, toutes les combinaisons de solvants donnent une allure de pic semblable. Toutefois, pour la combinaison en a), la molécule d'intérêt semble ne pas être retenue par la colonne puisqu'elle sort au volume mort ($t = 0$), donc au tout début de la chromatographie. Nos résultats montrent que le chromatogramme en c) offre la meilleure intensité du signal et la résolution la plus intéressante.

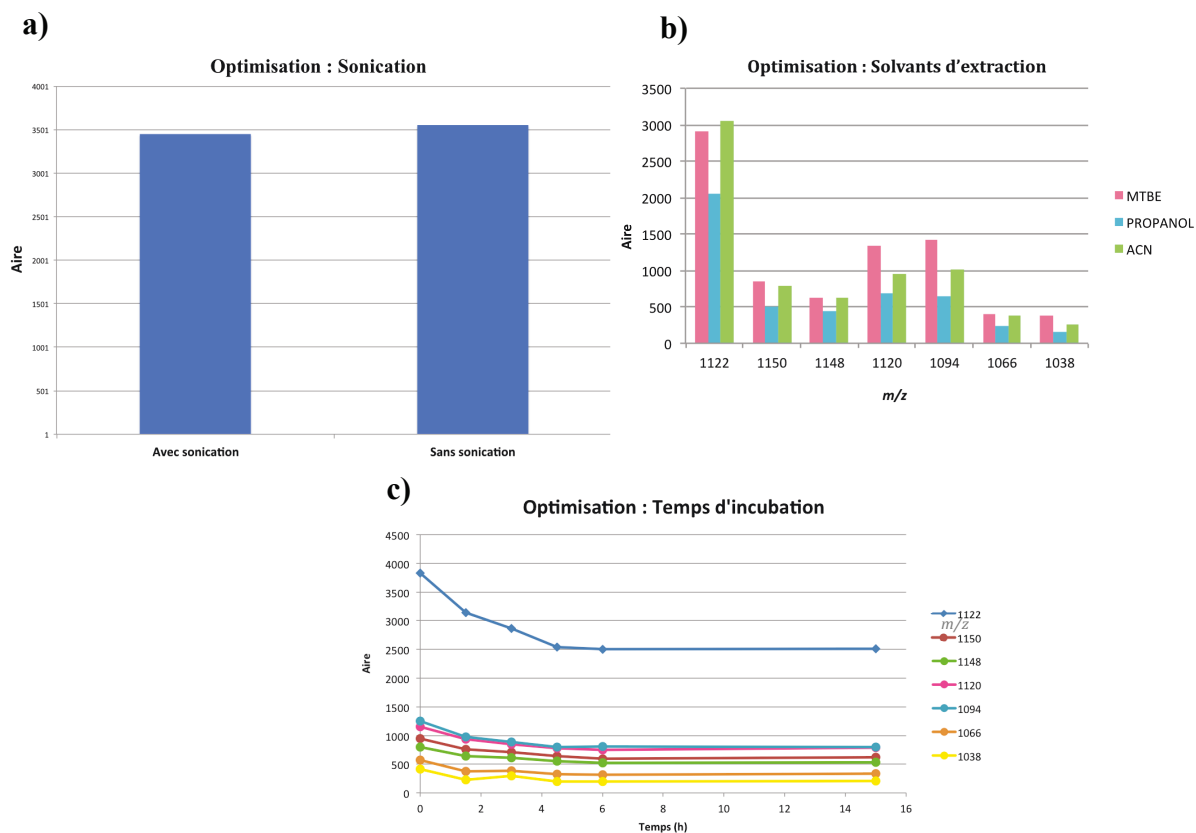
Figure 19. Chromatogrammes obtenus pour différentes combinaisons de phases mobiles en UPLC pour l'isoforme Gb₃(d18 :1)(C22 :0)Me. Trois combinaisons de solvants ont été testées : **a)** Acétonitrile/Eau/Ammonium formate; **b)** Acétonitrile/Eau et; **c)** Méthanol/Eau/Acide formique/Ammonium formate.



Le développement de la méthode d'extraction des échantillons peut débuter de façon conjointe dès que la méthode analytique permet une quantification relativement juste des molécules. Idéalement, une méthode d'extraction doit permettre d'extraire les molécules d'intérêt d'une matrice, dans notre cas l'urine, en éliminant le plus de substances interférentes ou de contaminants possibles. Cette extraction a aussi pour but de concentrer les biomarqueurs afin de faciliter leur quantification. La méthode d'extraction doit être développée en priorisant la sensibilité, la simplicité, la rapidité, la facilité de reproductibilité et la spécificité de la molécule à extraire. La Figure 22 montre quelques

exemples de paramètres optimisés lors de cette étude pour l'extraction des isoformes méthylés et non méthylés du Gb₃. Afin d'évaluer certains critères, il suffit de comparer des échantillons pour lesquels le paramètre à l'étude varie. Il est possible de constater que certaines étapes de la méthode de purification des échantillons ne favorisaient pas une meilleure extraction des molécules. De fait, la Figure 22 a) montre que l'absence ou la présence de sonication ne fournit pas de différence notable quant à la quantité de molécules extraites. Par ailleurs, la Figure 22 b) montre les résultats obtenus après avoir testé plusieurs solvants d'extraction, soit le méthyl tert-butyl éther (MTBE), le propanol et l'acétonitrile (ACN). L'analyse permet de conclure que le MTBE permet une meilleure extraction des biomarqueurs, bien que l'ACN montre un bon rendement d'extraction. Aussi, l'incubation prolongée des échantillons n'aide pas à leur extraction; au contraire, celle-ci semble avoir un impact négatif sur l'extraction (dégradation de l'échantillon) puisque l'aire diminue avec le temps (Figure 22 c).

Figure 20. Graphiques obtenus lors de l'optimisation de la méthode d'extraction des échantillons d'urine pour les isoformes méthylés du Gb₃ : **a)** Impact de la sonication ou non; **b)** des solvants d'extraction utilisés; **c)** du temps d'incubation des échantillons.



Il est important de s'assurer d'incorporer un standard interne à la méthode de quantification. Le standard interne est une molécule similaire à celle qui est analysée et permet, en plus de limiter l'effet de matrice, de corriger les variations potentielles des réponses obtenues par l'appareil. L'ajout d'une quantité fixe de standard interne dans tous les échantillons permet d'assurer une reproductibilité de la méthode. Finalement, en tenant compte de la gamme de concentration à couvrir et du nombre de points nécessaires à une quantification juste, une courbe de calibration peut être développée.

Lorsque la méthode est développée et optimisée, elle sera soumise au processus de validation analytique, certifiant que celle-ci répond aux critères acceptables en laboratoire.

1.8.2 Principes de la validation d'une méthode

La validation est l'étape critique du développement d'une méthode. Elle permet d'évaluer si chacune des étapes du développement a été optimisée de façon adéquate et si les critères de qualité sont respectés. Si le développement de la méthode a été effectué avec rigueur, le travail sera récompensé au moment de la validation analytique. La validation est aussi une assurance pour les autres laboratoires, que la méthode être technologiquement transférable et qu'elle est robuste.

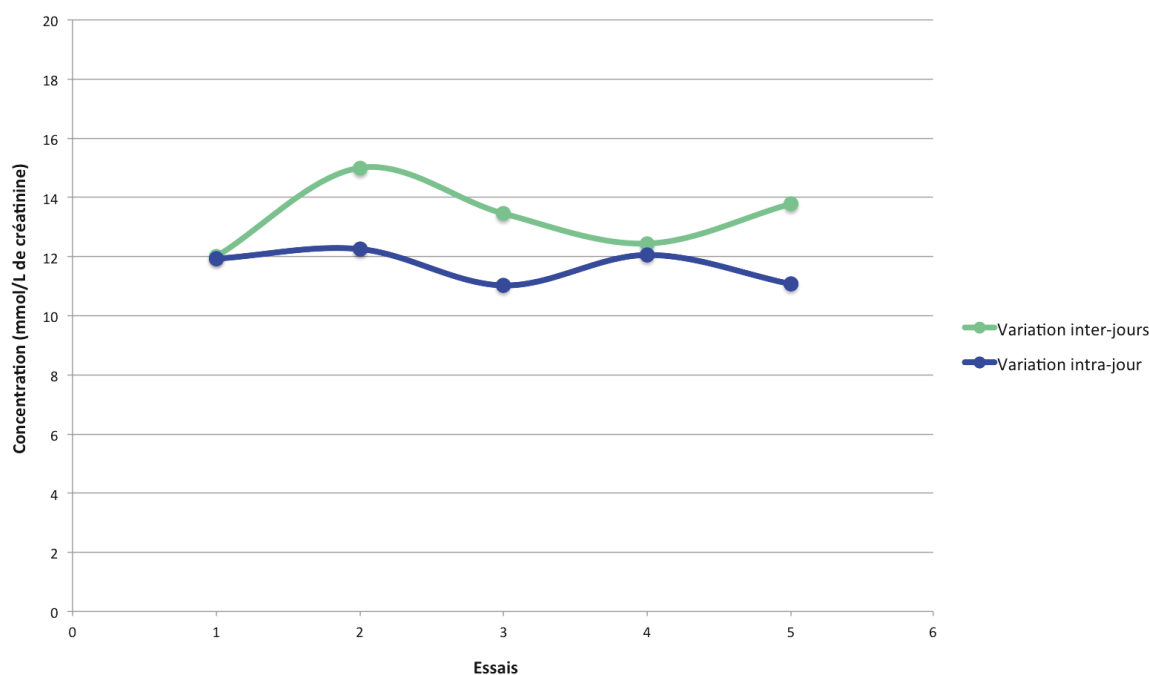
Tableau 5. Paramètres évalués lors de la validation analytique.

Paramètres	Barème à respecter
Précision intra-jour et inter-jours	CV <15%
Linéarité	$R^2 > 0.995$
Limite de détection	3 x Signal au bruit
Limite de quantification	10 x Signal au bruit
Justesse	Biais <15%
Robustesse	Même concentration, 10 urines différentes
Stabilité à long terme	4°C, TP, -20°C, -80°C

Les paramètres habituellement évalués lors de la validation sont présentés dans le Tableau 5. Afin d'évaluer la précision intra-jour et inter-jours de la méthode, un échantillon de faible concentration et un échantillon de concentration élevée sont analysés à 5 reprises,

durant la même journée et durant 5 journées différentes (Voir Figure 23). Puisqu'il s'agit du même échantillon, les valeurs obtenues ne devraient pas varier de plus de 15%. Une variation de 20% est toutefois tolérée pour les échantillons de basses concentrations s'approchant de la limite de quantification.

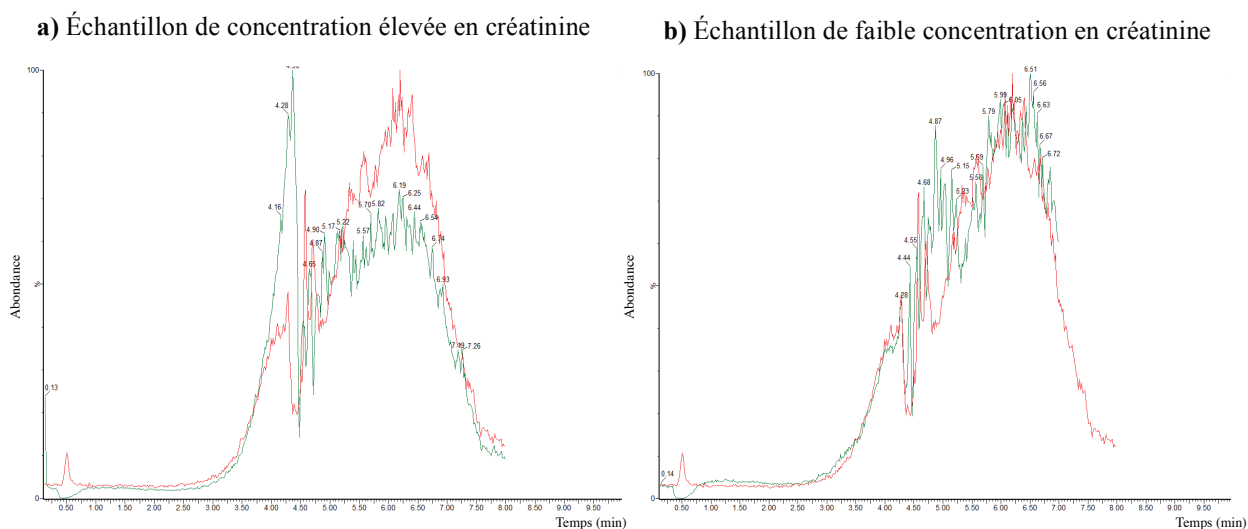
Figure 21. Résultats obtenus lors de l'évaluation de la précision intra-jour (n=5) et inter-jours (n=5) pour la créatinine urinaire lors de cette étude. La variation entre les analyses ne doit pas excéder 15% afin que la méthode soit jugée précise.



En ce qui a trait à la linéarité de la courbe de calibration pour chacune des analyses, le coefficient de régression de ladite courbe (R^2) doit être supérieur à 0.995 et chacun des points de la courbe ne doit pas avoir un écart à la courbe de plus de 15%. Les limites de détection (LOD, plus petite valeur détectable) et de quantification (LOQ, plus petite valeur quantifiable) doivent être établies lors de la validation analytique afin de pouvoir établir les limites de la méthode. La justesse de la méthode peut être évaluée en quantifiant un échantillon de concentration connue afin d'évaluer si la valeur obtenue par la méthode de quantification diffère de moins de 15%. La robustesse, quant à elle, est évaluée en analysant 10 échantillons de matrices différentes dans laquelle une molécule de concentration connue est ajoutée. Si l'effet de matrice est négligeable, les valeurs de

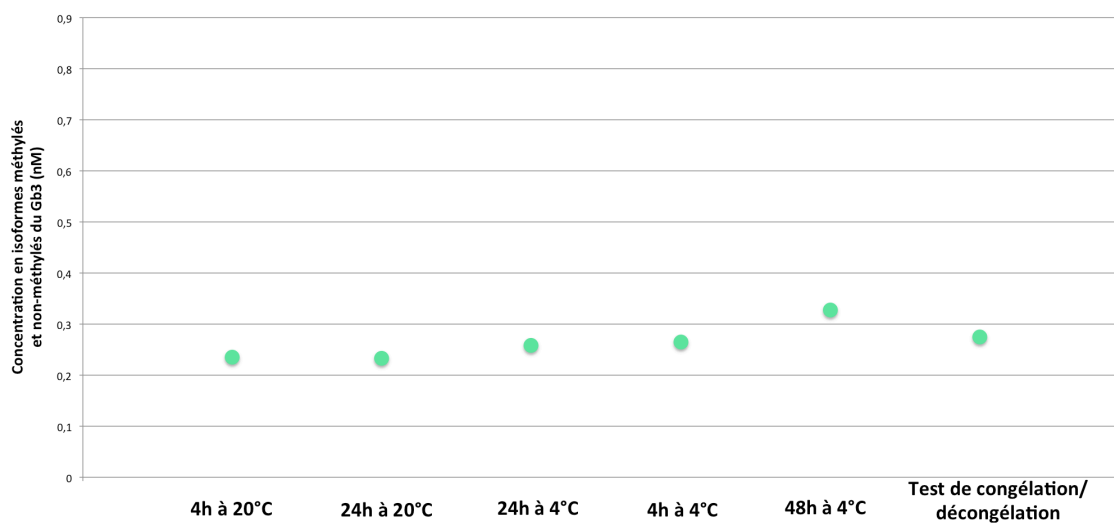
concentrations obtenues de la molécule testée devraient être identiques même si les matrices diffèrent. L'effet de matrice correspond à l'augmentation ou à la diminution du signal de la molécule d'intérêt à cause de la présence d'autres molécules présentes dans l'échantillon qui viennent interférer. Si cet effet n'est pas pris en compte, une molécule dans deux échantillons de composition différente, mais dont la concentration est la même, pourrait donner des résultats différents. La Figure 24 montre un exemple d'effet de matrice, où la concentration de l'échantillon (chromatogramme en vert) mène à une diminution du signal par rapport au standard (chromatogramme en rouge).

Figure 22. Deux tests démontrant la présence d'un effet de matrice. Le chromatogramme en rouge représente le standard interne, pour lequel la concentration est la même pour les Figures **a)** et **b)**. Les résultats en vert représentent deux urines ayant la même concentration en biomarqueurs, mais pour lesquelles la concentration en créatinine est différente. La Figure **a)**, provenant d'un échantillon avec une concentration en créatinine élevée, montre une suppression ionique puisque l'intensité du signal est diminuée par rapport au standard interne, ce qui n'est pas le cas pour la Figure **b)**, provenant d'un échantillon de faible concentration en créatinine.



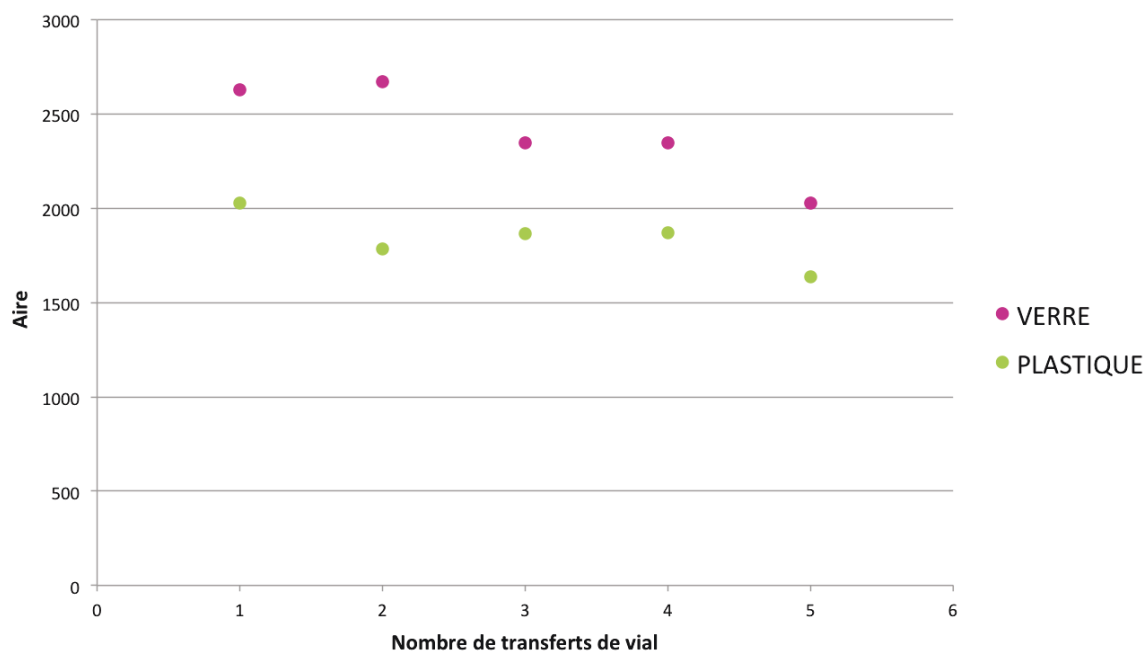
Finalement, la stabilité des échantillons et des molécules à quantifier doit être démontrée à différentes températures et à des intervalles de temps spécifiques, afin que les échantillons soient entreposés et traités de façon efficace (Van Eeckhaut *et al.*, 2009). La Figure 25 montre des exemples d'essais de stabilité pour lesquels l'écart entre les concentrations obtenues ne doit pas excéder 15%.

Figure 23. Résultats obtenus pour l'évaluation de la stabilité à différentes températures et à différents délais de temps, pour les isoformes méthylés et non-méthylés du Gb₃ pour cette étude. La variation entre les analyses ne doit pas excéder 15% afin que les échantillons soient jugés stables à certaines conditions données. La concentration obtenue suite à une série de trois congélation/décongélation est présentée et montre que celles-ci n'a aucun impact sur la conservation de l'échantillon, puisque la concentration reste la même. Il n'y a donc aucun risque de dégradation de l'échantillon lorsque ceux-ci sont décongelés et recongelés trois fois.



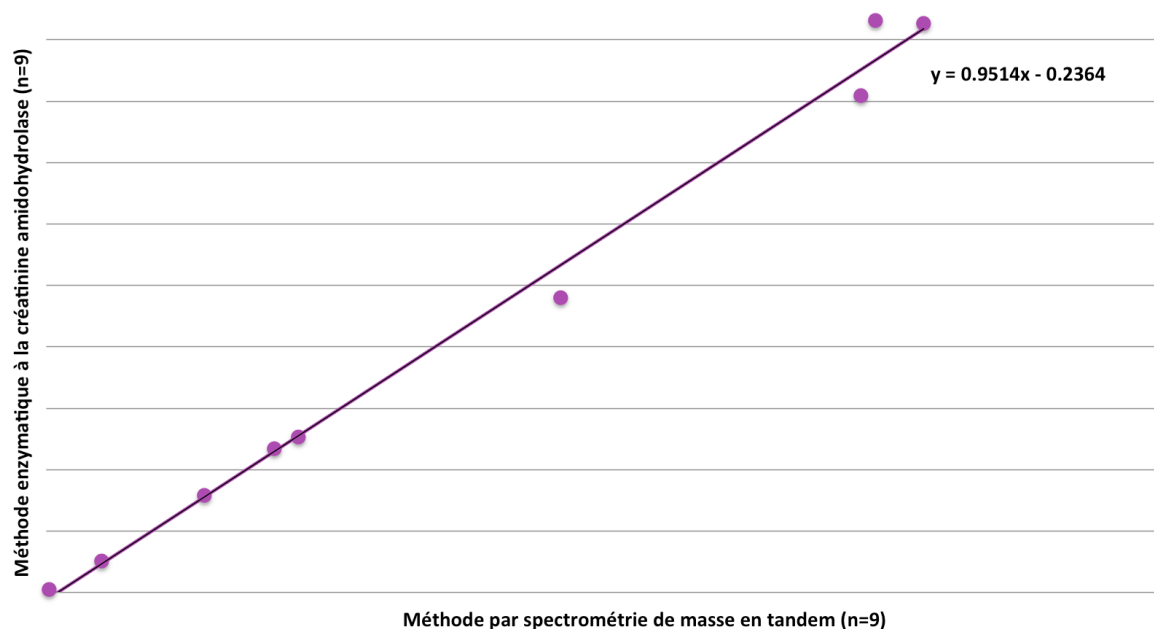
Des tests supplémentaires plus spécifiques à la méthode développée sont parfois nécessaires et doivent aussi être effectués. En effet, pour cette étude, l'adhésion des molécules d'intérêt au verre et au plastique a été évaluée (Figure 26). Il suffit de transférer plusieurs fois un échantillon d'un vial à l'autre et de s'assurer que la concentration en biomarqueurs contenue dans chacun de ceux-ci ne varie pas de façon significative (>15%). Ce test a permis de valider l'utilisation de vial en verre pour cette étude, puisqu'il semble que les molécules adhèrent moins à la paroi de ce matériau (aire plus élevée pour le verre que pour la plastique après un seul transfert). Il reste qu'en temps normal, l'échantillon est déposé dans un vial et aucun transfert n'est effectué lors de l'analyse, ce qui diminue la probabilité de perte d'échantillon.

Figure 24. Test d'adhésion aux parois de verre et de plastique pour les isoformes méthylés et non-méthylés du Gb₃ selon le nombre de transferts effectués. Chaque point représente l'aire totale des isoformes méthylés et non-méthylés du Gb₃ en fonction du nombre de transferts d'un vial à l'autre.



Lorsque la molécule utilisée pour la normalisation n'est pas quantifiée avec une méthode déjà disponible et validée, celle-ci doit se plier à la même validation que celle expliquée ci-dessus. De plus, il est important de s'assurer que les valeurs obtenues par la nouvelle méthode sont identiques aux méthodes déjà utilisées et validées dans les laboratoires de référence. De fait, dans cette étude, la concentration en créatinine obtenue avec la méthode développée par spectrométrie de masse en tandem a été comparée avec des échantillons analysés selon une méthode enzymatique pour la créatinine amidohydrolase disponible commercialement (méthode "Creatinine Plus" utilisée sur un appareil Cobas® de la compagnie Roche Diagnostics GmbH). La comparaison entre les résultats obtenus par les deux méthodes permet de valider que la méthode développée dans cette étude est fiable et représentative des concentrations de créatinine pour les mêmes échantillons (Figure 27).

Figure 25. Comparaison des concentrations de créatinine urinaire obtenues pour 9 patients avec la méthode enzymatique à la créatinine aminohydrolase et avec la méthode développée par spectrométrie de masse en tandem dans cette étude.



1.9 Présentation du projet

1.9.1 Problématique et hypothèse

La pertinence de continuer la recherche de nouveaux biomarqueurs pour la maladie de Fabry est liée à la limitation des molécules utilisées actuellement qui ne corréleront pas nécessairement avec la sévérité et la progression de la maladie, à l'amélioration de la compréhension de ladite maladie, ainsi qu'à l'avancement des connaissances du métabolisme des glycosphingolipides impliqué dans cette maladie. L'identification en 2012 de 5 nouveaux groupes de biomarqueurs pour la maladie de Fabry a permis d'ouvrir la porte à de nouvelles pistes de recherche et à un certain questionnement tel : certaines de ces molécules auraient-elles le potentiel de mener à une nouvelle compréhension de la maladie? Leur pertinence comme biomarqueurs est-elle envisageable pour évaluer la sévérité et la progression de la maladie?

L'un des groupes de biomarqueurs identifiés est constitué de 7 isoformes comportant une méthylation au niveau de l'atome d'azote de la molécule de Gb₃ (Figure 28). La position de la méthylation a pu être déterminée à l'aide d'un spectre de fragmentation représenté à la Figure 29 (Auray-Blais et Boutin, 2012). Sur celui-ci, chacun des pics du spectre représente un fragment de la molécule mère. Le fragment ayant un rapport m/z 296.3 représente la sphingosine avec la méthylation. En se basant sur ce fragment seulement, l'hypothèse serait que la méthylation se situe soit sur la sphingosine, soit sur l'atome d'azote. Toutefois, le fragment à m/z 354.4 représente l'acide gras avec la méthylation. En considérant simplement ce fragment, il est possible de supposer que la méthylation se situe sur l'acide gras ou sur l'atome d'azote. Certes, lorsque l'on tient compte de ces deux fragments, la seule position commune est l'atome d'azote, confirmant ainsi la position de la méthylation.

Figure 26. Structures chimiques des 7 isoformes méthylés du Gb₃ avec leur variation sur l'acide gras (-R) et leur masse respective (m/z).

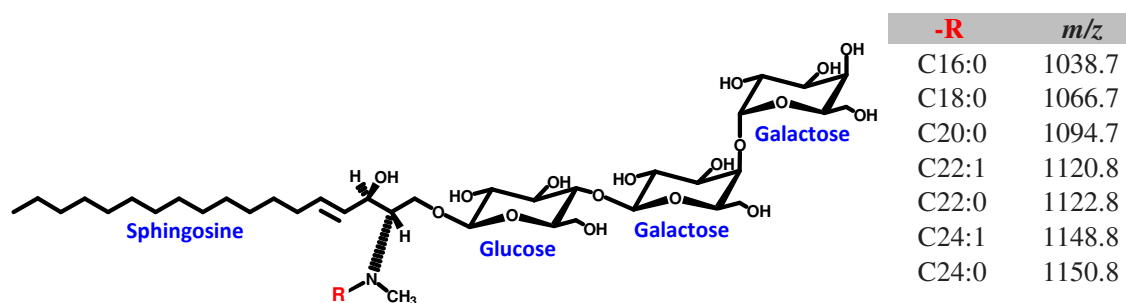
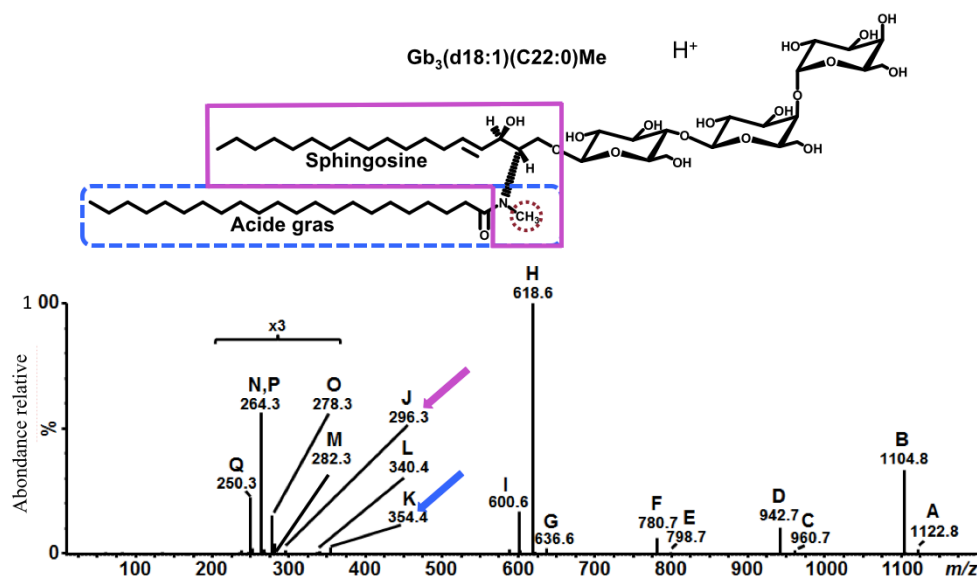
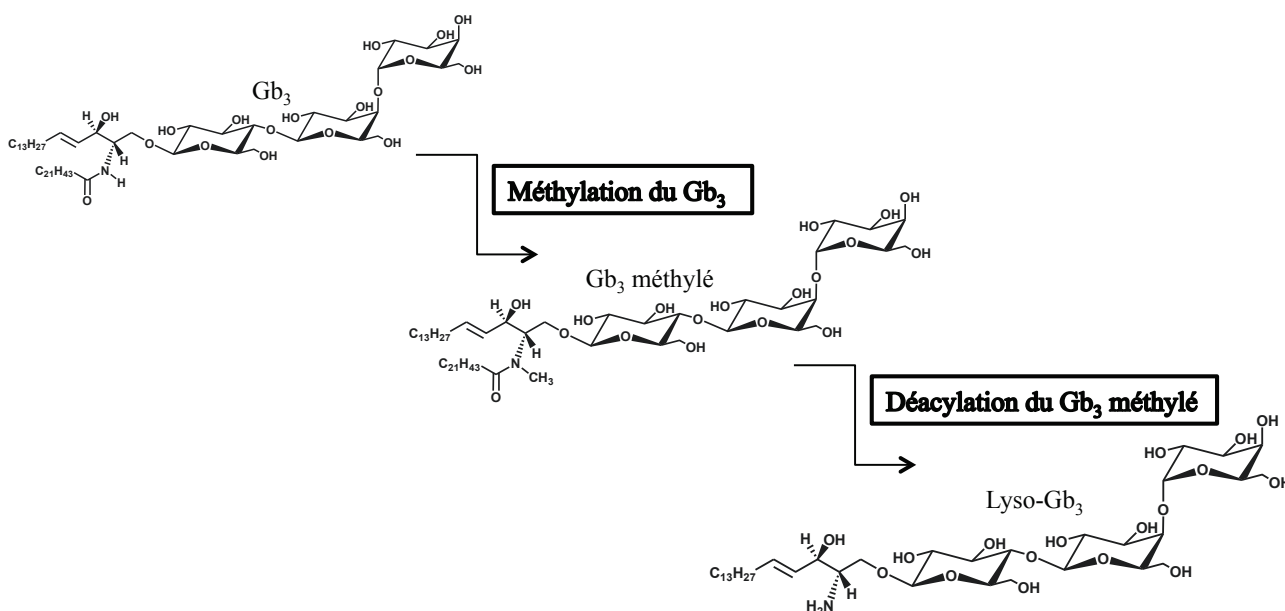


Figure 27. Exemple du spectre de fragmentation de l'isoforme Gb₃(d18:1)(C22:0)Me.



La disposition de la méthylation sur la molécule de Gb₃ mène à l'hypothèse que ces isoformes méthylés pourraient être des intermédiaires métaboliques entre la molécule de Gb₃ et celle du lyso-Gb₃. Tel que montré à la Figure 30, le Gb₃ serait premièrement méthylé, pour ensuite être déacylé pour former la molécule de lyso-Gb₃. L'implication des processus de méthylation catalysée par les méthyltransférases a d'ailleurs été observée dans divers processus biologiques (Auray-Blais et Boutin, 2012; Bai *et al.*, 2007; Dhall et Chatterjee, 2011; Finkelstein, 2007; Lohse *et al.*, 2011; Patti *et al.*, 2012).

Figure 28. Métabolisme intermédiaire possible entre le globotriaosylcéramide et le globotriaosylsphingosine, impliquant les isoformes méthylés du Gb₃.



1.9.2 Objectifs

L'objectif principal du projet est donc de développer et de valider une méthode d'analyse quantitative des isoformes méthylés du Gb₃ normalisés à la créatinine urinaire utilisant la spectrométrie de masse en tandem. Les objectifs secondaires sont : 1) de doser les biomarqueurs sur une large cohorte de patients atteints de la maladie de Fabry et de contrôles sains; 2) de comparer la concentration des isoformes méthylés du Gb₃ urinaire avec la concentration de Gb₃ non-méthylés; 3) d'évaluer les corrélations possibles entre les

biomarqueurs quantifiés et le génotype, l'âge et le sexe des patients; et 4) de tenter de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie de Fabry.

1.9.3 Perspectives du projet face au domaine clinique

Ultimement, l'objectif serait de pouvoir offrir aux patients l'analyse d'une large gamme de biomarqueurs qui serait appropriée selon que le patient Fabry présente la forme classique de la maladie ou une variante cardiaque ou rénale. En identifiant les biomarqueurs qui corrélerent avec certaines manifestations cliniques et la sévérité de la maladie, il serait possible de traiter le patient efficacement dépendamment des taux d'excrétion des différents types de biomarqueurs. La découverte et la quantification de biomarqueurs ont aussi pour but de diminuer le nombre de faux-négatifs en trouvant des biomarqueurs dont la concentration est élevée chez les patients et donc permettre un diagnostic efficace de ces derniers. Tel que mentionné précédemment, certains biomarqueurs utilisés actuellement ne sont pas augmentés chez les patients ayant des mutations menant à des formes plus tardives de la maladie (ex. variante cardiaque), ainsi que chez certaines femmes pour lesquelles l'excrétion est moins importante. Il est donc devenu primordial d'étudier l'implication et le rôle des isoformes méthylés du Gb₃ chez les patients Fabry et d'évaluer la pertinence d'ajouter leur dosage aux méthodes connues de dépistage de la maladie. Ultimement, et si tel est le cas, il serait intéressant de développer ladite méthode par prise d'échantillon urinaire sur papier filtre, afin de faciliter le transport des échantillons directement par envoi postal.

ARTICLE 1

Tandem Mass Spectrometry Multiplex Analysis of Methylated and Non-Methylated Urinary Gb₃ Isoforms in Fabry Disease Patients

Mona Abaoui, Michel Boutin, Pamela Lavoie, Christiane Auray-Blais

Article publié dans *Clinica Chimica Acta*

Mona Abaoui a accompli le travail de laboratoire à l'origine de cet article. Elle a effectué toutes les étapes nécessaires au développement de la méthode de quantification présentée, ainsi que l'analyse des échantillons faisant partie de l'étude, sous l'étroite supervision des co-auteurs. Avec l'aide des co-auteurs, elle a rédigé l'article pour lequel elle a procédé à l'analyse statistique et à la présentation des résultats sous forme de figures et de tableaux.

Résumé

La maladie de Fabry est une maladie de surcharge lysosomale liée à l'X, causée par une mutation dans le gène *GLA*, codant pour la protéine alpha-galactosidase A. Elle mène à l'accumulation de glycosphingolipides dans les liquides et les tissus biologiques des patients. Ceux-ci peuvent présenter de l'acroparesthésie, des angiokératomes, des problèmes ophtalmologiques, ainsi que des problèmes rénaux, cardiaques et du système nerveux central pouvant mener à une mort prématurée si le patient n'est pas traité. Actuellement, le globotriaosylcéramide (Gb₃) et le globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) sont utilisés pour le dépistage et le diagnostic de la maladie de Fabry. Cependant, ces biomarqueurs ne sont pas toujours présents en quantité élevée chez les patients ayant une activité enzymatique résiduelle, notamment chez ceux présentant une variante cardiaque de la maladie. En utilisant des approches métabolomiques, notre équipe de recherche a récemment identifié un groupe de 7 isoformes méthylés du Gb₃, qui semblent être impliqués dans le métabolisme intermédiaire entre le Gb₃ et le lyso-Gb₃. Les objectifs de cette étude étaient: 1) de développer et de valider une méthode de quantification par spectrométrie de masse en tandem pour les isoformes méthylés et non-méthylés du Gb₃, ainsi que la créatinine urinaire ; 2) d'effectuer l'analyse de ces biomarqueurs chez une large cohorte de patients Fabry et de contrôles sains; et 3) d'évaluer s'il y a des corrélations entre l'excrétion urinaire de ces biomarqueurs avec l'âge, le sexe, le génotype et le traitement de patients Fabry. Les échantillons d'urine provenant de 150 patients Fabry et de 95 contrôles sains ont été analysés. Ceux-ci ont été purifiés en utilisant une extraction liquide-liquide. Les échantillons purifiés ont été injectés dans un spectromètre de masse en tandem Xevo-TQS couplé à un système de chromatographie en phase liquide à ultra performance ACQUITY UPLC I-Class. Au total, 15 biomarqueurs spécifiques à la maladie de Fabry ont été quantifiés et normalisés à l'aide de la créatinine urinaire. Des corrélations statistiquement significatives ($p < 0.001$) ont été établies entre le niveau d'excrétion de biomarqueurs, le sexe et le traitement des patients. L'analyse urinaire de 5 patients Fabry portant la mutation à variante cardiaque p.N215S a montré des niveaux anormaux en isoformes méthylés du Gb₃ chez tous ces patients, lesquels présentaient des niveaux normaux d'isoformes non-méthylés du Gb₃. Ces biomarqueurs pourraient donc s'avérer utiles pour le dépistage de patients Fabry portant des mutations à variante cardiaque de la maladie.

Tandem Mass Spectrometry Multiplex Analysis of Methylated and Non-Methylated Urinary Gb₃ Isoforms in Fabry Disease Patients

Mona Abaoui, Michel Boutin, Pamela Lavoie, Christiane Auray-Blais*

Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4

Grant support: This research was funded in part by grants-in-aid of research from Genzyme and the Canadian Institutes of Health Research.

Disclaimer: The funding organizations played no role in the design of the study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, and preparation or approval of manuscript.

***Corresponding author:** Christiane Auray-Blais, LL.M., Ph.D.

Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics

Faculty of Medicine and Health Sciences

Université de Sherbrooke

CHUS, Hospital Fleurimont

3001, 12th Avenue North

Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

Tel.: +1-819-564-5253; Fax: +1-819-564-5217.

E-mail: Christiane.auray-blais@usherbrooke.ca

Abbreviations

OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man; α -GAL A, α -galactosidase A; ERT, enzyme replacement therapy; CFDI, Canadian Fabry Disease Initiative; Gb₃ or GL-3, globotriaosylceramide; CTH, ceramide trihexoside; Ga₂, galabiosylceramide; CDH, ceramide dihexoside; lyso-Gb₃, globotriaosylsphingosine; REB, Research Ethics Board; CHUS, Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke; MeOH, methanol; H₂O, water; MTBE, methyl tert-butyl ether; IS, internal standard; RSDs, relative standard deviations; ESI+, positive electrospray ionization; MRM, multiple reaction monitoring; LQC, low quality control; HQC, high quality control. LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification

Highlights

- UPLC-MS/MS method was developed for relative quantification of various Gb₃ isoforms.
- Patients showed high methylated/non-methylated Gb₃ isoform levels *versus* controls.
- Methylated Gb₃ isoforms were generally absent or in trace amounts in control urine samples.
- Biomarker correlations were evaluated with age, gender and ERT treatment of patients.
- Patients with p.N215S mutation excreted abnormal levels of methylated Gb₃ isoforms.

Abstract

Fabry disease is a lysosomal storage disorder leading to the accumulation of glycosphingolipids in biological fluids and tissues. Globotriaosylceramide (Gb₃) and globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) are currently used for Fabry screening and diagnosis. However, these biomarkers are not always elevated in Fabry patients with residual enzyme activity. Our research team recently identified 7 urinary methylated Gb₃-related isoforms. The aims of this study were (1) to develop and validate a novel LC-MS/MS method for the relative quantification of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms normalized to creatinine, (2) to evaluate these biomarkers in Fabry patients and healthy controls, and (3) to assess correlations between biomarker urinary excretion with age, gender, treatment and genotype of patients.

Urine samples from 150 Fabry patients and 95 healthy controls were analyzed. Samples were purified and injected in the tandem mass spectrometer working in positive electrospray ionization. Relative quantification was performed for fifteen methylated and non-methylated Gb₃ isoforms. Significant correlations ($p < 0.001$) were established between Gb₃ isoform levels, gender and treatment. Five patients with the late-onset cardiac mutation p.N215S showed abnormal levels of methylated Gb₃ isoforms compared to their non-methylated homologues.

Methylated Gb₃ isoforms might be helpful urinary biomarkers for Fabry patients with late-onset cardiac variant mutations.

Keywords: Fabry disease, globotriaosylceramide, methylated Gb₃ isoforms, non-methylated Gb₃ isoforms, tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS

1. Introduction

Fabry disease (OMIM 301500) is a multisystemic, X-linked lysosomal storage disorder caused by mutations in the *GLA* gene, leading to the deficiency of alpha-galactosidase A (α -GAL A, EC 3.2.1.22) and resulting in the accumulation of glycosphingolipids in organs, tissues, and biological fluids [1-2]. Over 600 mutations in the *GLA* gene have been identified to date [3]. Fabry male patients are usually more clinically affected than women. However, some female carriers may develop the disease with symptoms as severe as those in affected men [4]. Enzyme replacement therapy (ERT) treatment (as well as other treatments still under study [5-8]) is available for patients who present specific manifestations of the disease [9-10]. In Canada, indications for treatment are summarized by the Canadian Fabry Disease Initiative (CFDI) guidelines [11-12] (Supplementary Data section Table S-1). The incidence of Fabry disease is difficult to establish with estimations varying from 1:1 250 to 1:117 000 [13-15], which is probably an underestimate of the true incidence considering milder variants which are difficult to diagnose [16-18].

Glycosphingolipid biomarkers, such as globotriaosylceramide (Gb₃ or GL-3, also known as ceramide trihexoside (CTH)) [19-20] and galabiosylceramide (Ga₂ or ceramide dihexoside (CDH)) [19-22], are found to be abnormally elevated in Fabry patients. Moreover, a recent study showed that elevated levels of urinary Gb₃ in patients with heart disease who are not affected with Fabry disease are positively associated with near-term mortality [23]. The identification of a deacylated form of Gb₃, globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃), was also reported to be elevated in plasma of Fabry patients [24-27], as well as in urine [16, 28-29]. Recent time of flight mass spectrometry metabolomic studies have led to the discovery of lyso-Gb₃ related analogues with modified sphingosine moieties, thus emphasizing the variability of plasma [27] and urine [28] biomarkers in Fabry disease patients. In fact, most patients with the late-onset cardiac variant mutation p.N215S have normal levels of urinary Gb₃ isoforms [30] and often normal levels of lyso-Gb₃ itself, but abnormal levels of urinary analogues of lyso-Gb₃ [31]. The recent development of a method for the relative quantitative analysis of seven analogues of lyso-Gb₃ might be useful and reliable for the screening and diagnosis of patients with late-onset cardiac variants of the disease [31]. Considering the striking genotypic and phenotypic

variability in Fabry disease patients, the search for novel Fabry biomarkers, which correlate with disease severity and progression, is still on-going. Recent metabolomic studies, using time of flight mass spectrometry, revealed 5 groups of Fabry disease Gb₃-related biomarkers [32-33].

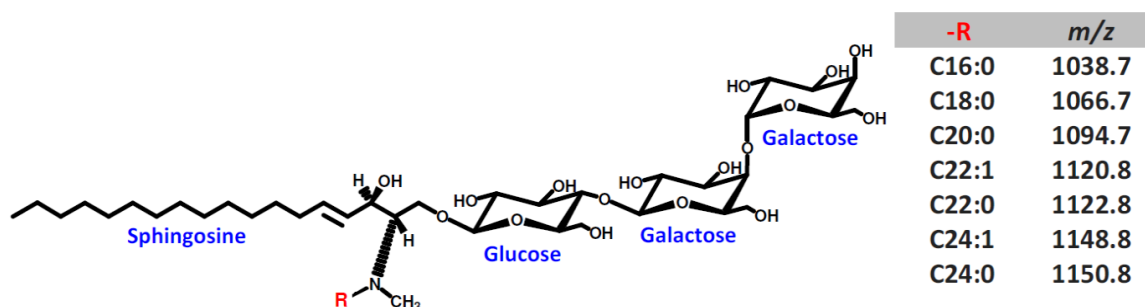


Figure 3. Chemical structure of the seven methylated Gb₃ isoforms with their fatty acid (-R) and the *m/z* ratios of their singly protonated molecular ions.

More specifically, the group of methylated Gb₃-related isoforms is comprised of seven isoforms with different fatty-acid chains and methylation of the nitrogen atom (Figure 1). The position of the methyl group was determined precisely by tandem mass spectrometry experiments [33]. For example, the isoform Gb₃(d18:1)(C22:0)Me had fragments at *m/z* 296.3 corresponding to the methylated sphingosine, and at *m/z* 354.4, corresponding to a methylated fatty acid, which confirmed the methylation on the nitrogen atom common to the sphingosine and fatty acid fragments [33]. Methyltransferases-catalyzed methylation has previously been reported in various biological processes [34-37]. It is noteworthy to mention that “isoforms” is the term applied to modifications on the Gb₃ fatty acid chain, whereas the term “analogues” is applied to modifications on the Gb₃ sphingosine chain [33].

To our knowledge, no other studies have been done for the quantification of both methylated and non-methylated Gb₃ isoforms in urine of Fabry patients. Therefore, in order to better understand the potential role of these methylated Gb₃ isoforms, we devised a study focusing on the following objectives: (1) to develop and validate a novel multiplex liquid chromatography-tandem mass spectrometry urinary method for the relative quantification of 7 methylated and non-methylated Gb₃ isoforms normalized to creatinine [38]; (2) to evaluate urinary levels of these biomarkers in a large cohort of adult and pediatric Fabry patients, and age- and gender-

matched healthy controls; and (3) to assess correlations between urinary excretion of these methylated Gb₃ isoforms with the patients age, gender, treatment and genotype.

2. Materials and methods

2.1 Ethics Approval

This project was approved by the Research Ethics Board (REB) of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CHUS).

2.2 Urine Collection

Urine samples were collected from Fabry patients and healthy controls and stored at -20°C until analysis. Fabry disease diagnosis was confirmed by enzyme analysis in leucocytes and/or identification of a pathogenic mutation in the *GLA* gene. Urine samples from 150 Fabry patients and 95 healthy controls were analyzed. Table 1 presents demographic data of Fabry patients and healthy controls. Urine samples from healthy controls were analyzed to establish normal reference values for methylated and non-methylated Gb₃ isoforms. In order to evaluate the impact of ERT on the excretion of Gb₃ methylated and non-methylated isoforms, urine samples from 5 Fabry patients were tested before and after ERT. Four of the treated patients were receiving agalsidase alfa at 0.2 mg/kg (Replagal®, Shire Human Genetic Therapies Inc., Lexington, MA) and one was receiving agalsidase-beta at 1.0 mg/kg (Fabrazyme®, Genzyme, A Sanofi Division, Cambridge, MA) provided biweekly, respectively.

Table 1. Demographics of Fabry patients and healthy controls.

Fabry patients								
	Adult cohort				Pediatric cohort			
	Males		Females		Males		Females	
	Untreated	Treated	Untreated	Treated	Untreated	Treated	Untreated	Treated
Number (n)	16	33	34	30	13	3	19	2
Mean age (y)	31	42	45	56	7	9	12	11
Median (Age range) (y)	34 (20-57)	44 (19-62)	30 (21-72)	56 (23-79)	7 (1-18)	8 (4-14)	11 (7-18)	11 (10-11)
Total (n)	49		64		16		21	
Healthy controls								
	Adult cohort				Pediatric cohort			
	Males		Females		Males		Females	
Number (n)	33		29		17		16	
Mean age (y)	43		41		12		12	
Median (Age range) (y)	44 (21-69)		41 (19-59)		12 (4-18)		11 (2-16)	
Total (n)			62				33	

2.3 Reagents

HPLC grade methanol (MeOH) was from EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Germany). Optima® LC/MS grade water (H₂O), CHROMASOLV® Plus HPLC grade Methyl tert-butyl ether (MTBE, 99.9%), ammonium formate (Amm. Form., 99%) and creatinine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Formic acid (FA, 99+%) was from Acros Organics (New Jersey, USA). Heptadecanoyl ceramide trihexoside (Gb₃(d18:1)(C17:0)) (98+%) and N-Octadecanoyl-D3-ceramide trihexoside (Gb₃(d18:1)(C18:0)D3) were purchased from Matreya (Pleasant Gap, PA). The creatinine-D3 (99.8 atom % D) standard was from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Quebec, Canada).

2.4 Sample Preparation

2.4.1 Processing Urine Samples from Fabry Patients and Healthy Controls

A liquid-liquid extraction was performed according to a method adapted from Matyash et al. [38]. Briefly, two internal standards (IS) were added to 500 µl of a urine sample deposited into a glass tube with a teflon-lined cap: 20 µl of Gb₃ IS (Gb₃(d18:1)(C18:0)D3, 47.4 µM) in MeOH and 25 µl of creatinine IS (creatinine-D3, 2.0 mM) in H₂O. Urine samples were evaporated to dryness under a nitrogen stream. Then, 1.5 ml of MeOH and 5 ml of MTBE were added. Samples were vortexed and left for 1 h at room temperature (~22°C). Liquid-

liquid extraction was performed by adding H₂O (1.5 ml). Samples were vortexed and left for 10 minutes at room temperature. To recover the upper organic phase, the lower aqueous phase was frozen in a mixture of dry ice and acetone. The upper layer was then easily transferred to another tube and evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Finally, the samples were resuspended in 200 µl of mobile phase A (MeOH/Amm. For. 5mM/FA 0.1%).

2.4.2 Calibration Curves

2.4.2.1 Gb₃ Calibration Curve

A 11-point Gb₃(d18:1)(C17:0) calibration curve was prepared. A stock solution was made by dissolving the commercial Gb₃(d18:1)(C17:0) standard with a solvent mixture (MeOH-CHCl₃ 2:1) to obtain a concentration of 48 µmol/L. Standard solutions were prepared by dilution of the stock solution in methanol to obtain the following concentrations: 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6 and 48.0 µmol/L (curve concentrations: 0, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 1926 nmol/L). Sample processing for Gb₃ calibrators was the same as mentioned previously, except that 20 µl of the 10 respective standard solutions of Gb₃(d18:1)(C17:0) were added to 500 µl of a urine sample from a healthy reference control before evaporation.

2.4.2.2 Creatinine Calibration Curve

A 8-point creatinine calibration curve was prepared. A stock solution of creatinine was prepared by adding 283 mg of creatinine to a 5 ml volumetric flask and made up to volume with H₂O. Standard solutions were prepared by diluting this solution in H₂O to obtain 30 ml of each solution at the following concentrations: 0, 1, 2, 5, 7.5, 10, 15, and 20 mmol/L. For each point, 25 µl of the creatinine internal standard was added to 500 µl of the respective standard solution. Sample processing for creatinine calibrators was the same as mentioned previously.

2.4.4 Instrumentation and Parameters

For the analysis of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms normalized to creatinine [39], an Acquity UPLC I-Class system (Waters Corporation, Milford, MA) coupled to a Xevo TQ-S

(Waters) tandem mass spectrometer was used. A CSH C18 column (2.1 mm x 50 mm, Waters) was selected for the analyses. All biomarker signals were acquired in positive electrospray ionization (ESI+) using the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Nineteen molecules were simultaneously analyzed: methylated Gb₃ isoforms (n=7), non-methylated Gb₃ isoforms (n=8), Gb₃(d18:1)(C17:0) standard, Gb₃(d18:1)(C18:0)D3 internal standard, creatinine and creatinine-D₃ internal standard. The method run time and the total analysis time between injections were 12 minutes and 13 minutes, respectively. Mass spectrometry parameters were optimized to obtain the highest sensitivity for methylated Gb₃ isoforms, which were less abundant in urine than the non-methylated ones. The TargetLynx 4.1 software (Waters) was used for the relative quantification of all molecules. The Gb₃ calibration curve was quadratic with a 1/x weighing function and the origin was excluded. Because of the unavailability of commercial calibration standards for all Gb₃ and methylated Gb₃ isoforms, a relative quantification was performed using Gb₃(d18:1)(C17:0) as a calibration reference compound for all analyzed Gb₃-related molecules. Mobile phase A was 5 mM Amm. For., 0.1% FA in methanol and mobile phase B was 5 mM Amm. For., 0.1% FA in 95:5 H₂O:MeOH. A UPLC gradient (flow rate at 0.25 mL/min) from 50 % to 100 % of mobile phase A was used to allow the elution of targeted molecules. UPLC and mass spectrometry parameters are presented in Supplementary Data section Table S-2 and Table S-3, respectively.

2.5 Statistical Analyses

SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 22.0.0.0 was used for all statistical analyses. Spearman's rank correlation coefficient was performed to evaluate correlations between levels of all Gb₃ isoforms and age. Correlations between gender, treatment and levels of Gb₃ biomarkers were tested using the Mann-Whitney U Test.

2.6 Method Validation

Validation parameters were assessed for methylated and non-methylated Gb₃ isoforms and urinary creatinine. A comparison between an enzymatic creatinine amino hydrolase reaction and the current tandem mass spectrometry method was also done. Urine samples from an untreated Fabry hemizygote (high quality control) and a pool of untreated Fabry heterozygotes

(low quality control) were submitted to intraday (5 replicates/day) and interday assay analyses (5 replicates/5 different days) to establish the precision of the method. Stability studies for methylated and non-methylated Gb₃ isoforms and urinary creatinine were performed with a urine sample left for 24 h at room temperature, for 48 h at 4°C, and for 3 weeks at -80°C. Finally, samples were submitted to 3 freeze/thaw cycles and stability of resuspended samples left in the UPLC autosampler (20°C) for 24 h was evaluated. According to the sample preparation described previously, the Gb₃ linearity response was assessed by preparing a 11-point calibration curve with extended concentration range: 0, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 and 1926 nmol/L. The creatinine linearity response was also evaluated by preparing a 8-point calibration curve with concentrations ranging from 0-20 mmol/L (0, 1, 2, 5, 7.5, 10, 15 and 20 mmol/L). Matrix effects on methylated and non-methylated Gb₃ isoforms were evaluated by spiking 6 healthy control urine samples (250 µl) (creatinine ranging from 0.5 mmol/L to 25.9 mmol/L) with the same amount of a Fabry patient urine sample (250 µl). All samples were then processed as usual and overall precision was evaluated. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were established using a low-excretor Fabry female urine sample. LOD was defined as 3 times the standard deviation of the response (area/area IS) (n=6) divided by the slope of the calibration curve. LOQ was defined as 10 times the standard deviation of the response (area/IS area) (n=6) divided by the slope of the calibration curve. The extraction recovery in percentage was evaluated for all Gb₃ isoforms using two sets (n=2) of urine samples: the first set was processed as previously described while the second was processed twice. Therefore, after the final evaporation, the second set was resuspended in 500 µl of H₂O and extracted a second time. The difference between biomarker levels of the two assay sets was used to measure the recovery from sample processing. For the Gb₃(d18:1)(C17:0) standard, extraction recovery was evaluated by comparing samples (n=2) for which the standard was added before and after the extraction, respectively. The adsorption of Gb₃ isoforms to plastic and glass was also evaluated by transferring the purified urine sample 4 times from a glass or plastic tube to another, using glass or plastic pipet tips, respectively. Samples were vortexed between each transfer.

3. Results and Discussion

3.1 Method Validation

The precision of the method was evaluated with intraday (n=5) and interday (n=5) assays for methylated and non-methylated Gb₃ isoforms and for urinary creatinine. Intraday relative standard deviations (RSDs) on the measured concentrations of all Gb₃ isoforms were $\leq 18\%$ for LQC and $\leq 12\%$ for HQC. The creatinine intraday precision was good with RSDs $\leq 5\%$ for both LQC and HQC. For the interday, LQC and HQC RSDs were $\leq 18\%$ for all Gb₃ isoforms and $\leq 10\%$ for creatinine. All precision assay results are in the Supplementary Data section Table S-4. Methylated and non-methylated Gb₃ isoforms were stable (variation less than 15%) after three freeze/thaw cycles, for at least 24 h at room temperature, 48 h at 4°C, and after 3 weeks at -80°C. The resuspended samples left for 24 h in the UPLC autosampler were also stable. The Gb₃ 11-point calibration curve (0-1926 nmol/L) presented a good mean coefficient of regression at 0.995 (n=5). The mean coefficient of regression for creatinine calibration curves was 0.998 (n=5). Gb₃ isoform recovery percentages from sample processing varied from 87 to 100% and was 94% for the Gb₃(d18:0)(C17:0) standard (n=2). Creatinine recovery was stable at 7%. The low recovery of creatinine in the upper organic phase after the liquid-liquid extraction process is due to its hydrophilicity. A comparison between an enzymatic creatinine amino hydrolase reaction (Creatinine Plus method used on a Cobas® from Roche Diagnostics GmbH) and the current tandem mass spectrometry method showed a good correlation ($y = 0.9514x - 0.2364$, $R^2 = 0.99175$). Variation due to matrix effects, which might lead to erroneous metabolite quantitation due to ion suppression or enhancement, showed a RSD at 13% for methylated and non-methylated Gb₃ isoforms. The losses due to adsorption of all Gb₃ isoforms to plastic and glass after 4 transfers were $\leq 10\%$. LOD and LOQ for all molecules are presented in the Supplementary Data section Table S-5.

3.2 Analysis of Fabry Gb₃ Isoforms in Urine

Figure 2 shows urine chromatograms of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms from a Fabry patient obtained after optimization of the UPLC and MS/MS parameters. The Gb₃(d18:1)(C18:0)D3 molecule was chosen as the IS because of the absence of biological

interferences and its commercial availability. Commercial Gb₃(d18:1)(C17:0) was chosen as the calibration standard. It has the same mass as the Gb₃ methylated isoform Gb₃(d18:1)(C16:0)Me which is not present in control urine samples used for the calibration curve.

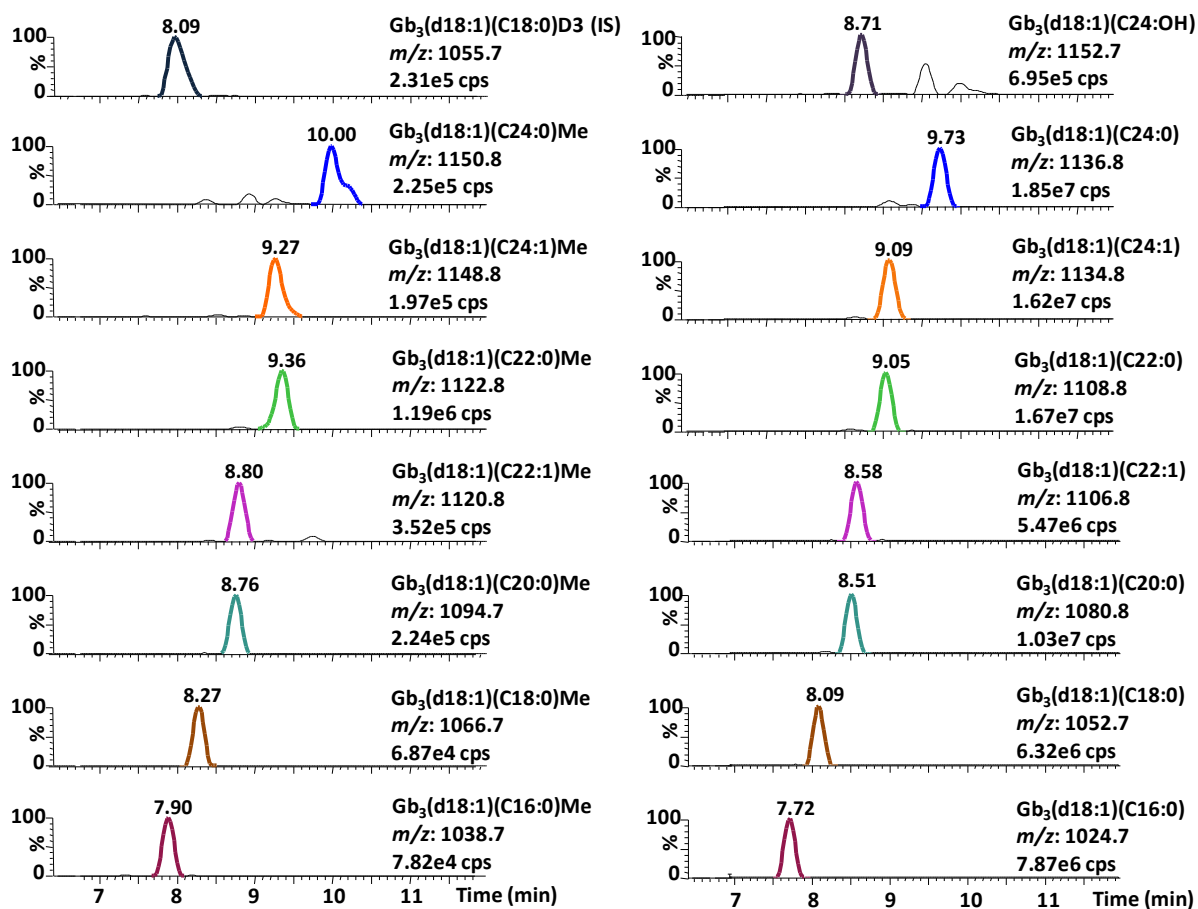


Figure 2. MRM chromatograms of 7 methylated Gb₃ isoforms and the Gb₃ IS (left side), 8 non-methylated Gb₃ isoforms (right side) in a urine sample from an untreated Fabry male (mutation R342X) with a creatinine of 3 mmol/L. The y axis corresponds to the relative abundance (in %). cps = counts per second.

A total of 150 Fabry patients and 95 age- and gender-matched healthy control urine samples were analyzed by UPLC-MS/MS. Our results show Spearman coefficients between 0.030 and 0.095, thus confirming that there is no correlation between age of Fabry patients and urinary levels of these Gb₃ biomarkers.

Supplementary Data Figure S-2 shows the relative distribution of methylated and non-methylated urinary Gb₃ isoforms in untreated and treated Fabry males, females and children. Outer and inner circles represent methylated and non-methylated Gb₃ isoforms, respectively. Methylated and non-methylated Gb₃ isoforms having the same fatty acid moiety share the same color and motif in Figure S-2. For all patient groups, methylated and non-methylated Gb₃ isoforms do not show the same relative distribution. The isoform C22:0 is definitely the most abundant (ranges from 38 to 50%) in the methylated group, while its non-methylated counterpart has the second or third highest relative abundance in the non-methylated group (ranges from 20 to 26%). Long chain isoforms (C24:0 and C24:1) are among the three most abundant isoforms in the non-methylated group (23-33%), but show lower abundance in the methylated group (5-10%). For methylated Gb₃ isoforms, the order of relative abundance is similar for males, females and children. However, it seems that untreated and treated males excrete approximately 10% more Gb₃(d18:1)(C22:0)Me than the other groups. Based on a Mann-Whitney U test, relative biomarker distribution does not change significantly between treated and untreated patients except for isoforms Gb₃(d18:1)(16:0) in men and isoform Gb₃(d18:1)(C18:0) in women ($p < 0.001$). For non-methylated Gb₃ isoforms, relative distributions are similar for untreated males, females and children, while treated male and children patients show less of the C24:1 isoform.

Figure 3 shows methylated Gb₃ isoform abundances in untreated and treated Fabry males, females, and children, as well as age- and gender-matched healthy controls. Supplementary Data Table S-6 and Figure S-1, respectively present all raw data related to this figure and the relative distribution for non-methylated Gb₃ isoforms. All biomarker excretion levels were normalized to urinary creatinine. Mean and ranges (minimum–maximum values) are provided for each group. Our results show similar profiles for all isoforms: untreated Fabry males is among the highest excretor group, followed by treated Fabry males and untreated Fabry females. A strong correlation was demonstrated between gender and biomarker levels using a Mann-Whitney U Test ($p < 0.001$). Previous studies have shown the same correlation with lyso-Gb₃ and related analogues [16,29] and with Gb₃ [40]. Except for Gb₃(d18:1)(C22:0)Me, which was present in trace amounts in some healthy control urine samples, methylated Gb₃ isoforms were not present in urine of control males and females. The Supplementary Data Table S-7

presents the age, gender, concentration of Gb₃ methylated isoforms and mutations of Fabry patients and controls.

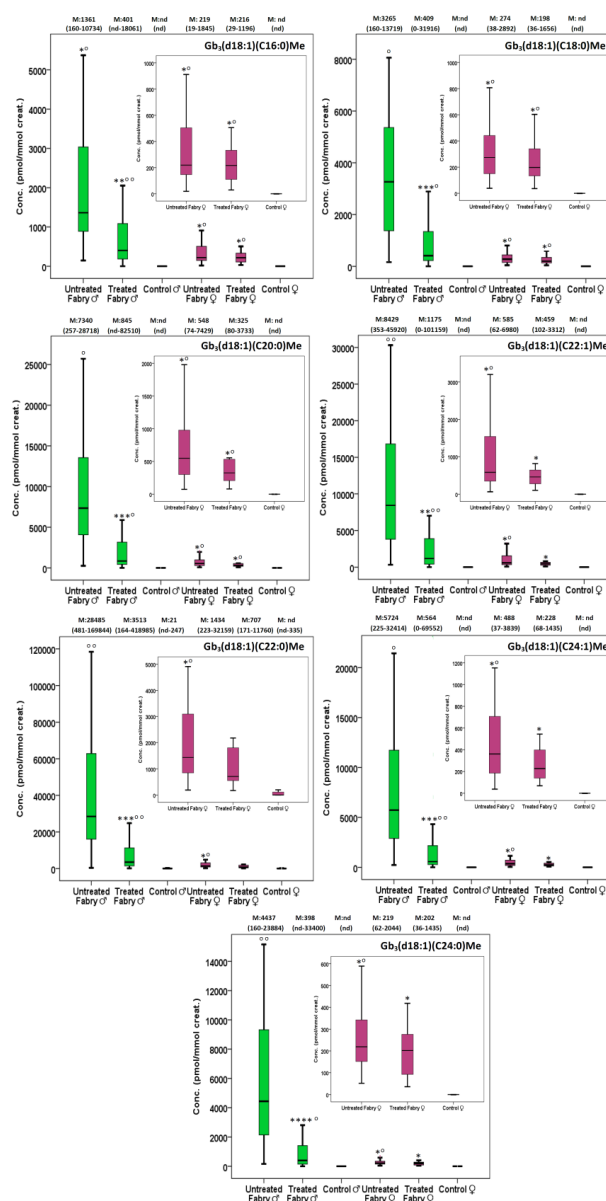


Figure 3. Methylated Gb₃ isoform abundances (concentration in pmol/mmol creat.) in untreated Fabry males (n=29), treated Fabry males (n=36), healthy control males (n=50), untreated Fabry females (n=53), treated Fabry females (n=32) and healthy control females (n=45). Males are represented by the symbol "♂" and females by "♀". M=median; minimum and maximum are in brackets. The bold horizontal line is the median. The lower and upper limits shown by the boxplots are the 25th and 75th quartiles. The ends of the whiskers represent the lowest value within 1.5 interquartile range of the 25th quartile and the highest value within 1.5 interquartile range of the 75th quartile. Circles represent outlier values (>1.5 interquartile ranges over the 75th quartile) and asterisks represent extreme values (>3 interquartile ranges over the 75th quartile).

3.3 Comparison Between Excretion of Methylated and Non-Methylated Gb₃ Isoforms

Table 2 shows ratios in percentage between the excretion levels of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms in adult and pediatric cohorts. Non-methylated Gb₃ isoforms were more abundant than their Gb₃ methylated counterparts, but in varying proportion for each isoform. Ratios of isoforms with long chain fatty acids (C24:0 and C24:1) were lower (1-7%) than isoform ratios with medium chains (C18:0-C22:0) (10-52%). In fact, medium chain fatty acids such as C22:1 and C18:0, which were not the most abundant methylated isoforms in absolute value, present the highest ratios, followed by C20:0 and C22:0. Ratios of excretion levels between lyso-Gb₃ and methylated Gb₃ isoforms are presented in Table 3. Lyso-Gb₃/creatinine results were obtained from another study using the same urine samples for all patients [35] involved in the current project. In the adult cohort, these ratios correlated with treatment ($p < 0.001$ for males and $p < 0.05$ for females). Both untreated Fabry males and females presented a ratio of 0.4%, which increased to 1.3% and 1.6%, respectively, in treated patients. In the pediatric cohort, ratios are 0.2% for untreated males and females, which is similar to the ratios from treated patients. Further studies with larger pediatric cohorts will be necessary to be able to draw definite conclusions about these latter results.

Table 2. Ratios in percentage between the excretion of each methylated and non-methylated Gb₃ isoforms in adult and pediatric cohorts.

Adult cohort							
	C16:0 (%)	C18:0 (%)	C20:0 (%)	C22:1 (%)	C22:0 (%)	C24:1 (%)	C24:0 (%)
Untreated Fabry Males (n=16)	12	29	18	36	33	3	3
Treated Fabry Males (n=33)	10	28	15	31	19	3	2
Untreated Fabry Females (n=34)	11	51	16	35	16	2	1
Treated Fabry Females (n=30)	14	42	23	41	21	4	4
Pediatric cohort							
Untreated Fabry Males (n=13)	6	15	10	24	11	2	1
Treated Fabry Males (n=3)	15	44	22	52	20	7	7
Untreated Fabry Females (n=19)	9	29	17	39	17	3	3
Treated Fabry Females (n=2)	12	45	18	51	18	5	5

Table 3. Ratios between excretion levels of lyso-Gb₃ and total Gb₃ methylated isoforms in adult and pediatric cohorts (Lyso-Gb₃/Methylated Gb₃ in %).

Adult cohort	
	Ratios (%)
Untreated Fabry Males (n=9)	0.4
Treated Fabry Males (n=25)	1.3
Untreated Fabry Females (n=18)	0.4
Treated Fabry Females (n=13)	1.6
Pediatric cohort	
Untreated Fabry Males (n=8)	0.2
Treated Fabry Males (n=3)	0.3
Untreated Fabry Females (n=9)	0.2
Treated Fabry Females (n=2)	0.2

Table 4 shows the effect of ERT treatment on methylated and non-methylated Gb₃ isoforms in 5 patients. Urinary biomarker levels decreased for all Gb₃ isoforms. Except for patient 2, for whom ERT reduced the biomarkers under study to a lesser degree (reduction of 65%), all patients showed a similar response to treatment for methylated Gb₃ isoforms and their non-methylated counterparts (from 90 to 98%). Except for patient 1, the four other patients reached a threshold value of about 5 000 pmol/mmol creatinine for methylated Gb₃ isoforms after ERT, independently of pre-ERT levels. Reference values, which are 256 pmol/mmol creatinine for methylated Gb₃ isoforms and 12 303 pmol/mmol creatinine for non-methylated Gb₃ isoforms, were established by adding 3 times the standard deviation to the average excretion value of healthy control urine samples (n=95).

Table 4. Concentrations of methylated (sum of the 7 measured species) and non-methylated Gb₃ isoforms (sum of the 8 measured species) in 5 patients before and after enzyme replacement therapy.

	Methylated Gb₃ isoforms (pmol/mmol creat.)			Non-methylated Gb₃ isoforms (pmol/mmol creat.)		
	Before ERT	After ERT	Reduction (%)	Before ERT	After ERT	Reduction (%)
Patient 1	265622	15192	94	1264329	129278	90
Patient 2	11030	4349	61	174627	60318	65
Patient 3	289029	6412	98	4353204	105119	98
Patient 4	91579	4457	95	1465710	69420	95
Patient 5	181088	4348	98	1536179	69710	95
Reference values	256			12 303		

3.4 Levels of methylated Gb₃ isoforms in patients with p.N215S mutation

The majority of Fabry patients with the p.N215S late-onset mutation had normal levels of urinary Gb₃ and lyso-Gb₃ [28]. This may lead to undiagnosed patients upon performing high-risk screening. However, a recent study has demonstrated that lyso-Gb₃ related analogues were markedly elevated in these patients [29]. In order to evaluate the impact of this cardiac variant mutation on urinary methylated Gb₃ isoforms, urinary biomarker levels were assessed in 5 patients with the p.N215S mutation (two samples were from the same patient, before and after ERT treatment (which are presented as (a) and (b), respectively in Figure 4). Figure 4 shows levels of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms as a ratio between levels of biomarkers in patients and healthy controls. These results show that methylated Gb₃ isoforms had a similar excretion profile as lyso-Gb₃ related analogues [29]. Patients with the p.N215S mutation showed increased levels of methylated Gb₃ isoforms compared to healthy controls, while non-methylated Gb₃ isoform levels were within normal value, or marginally elevated. Further studies with larger cohorts of patients with the p.N215S mutation are warranted to determine if there is a link between the urinary methylated Gb₃ isoform excretion profile and the lyso-Gb₃ excretion profile in these patients.

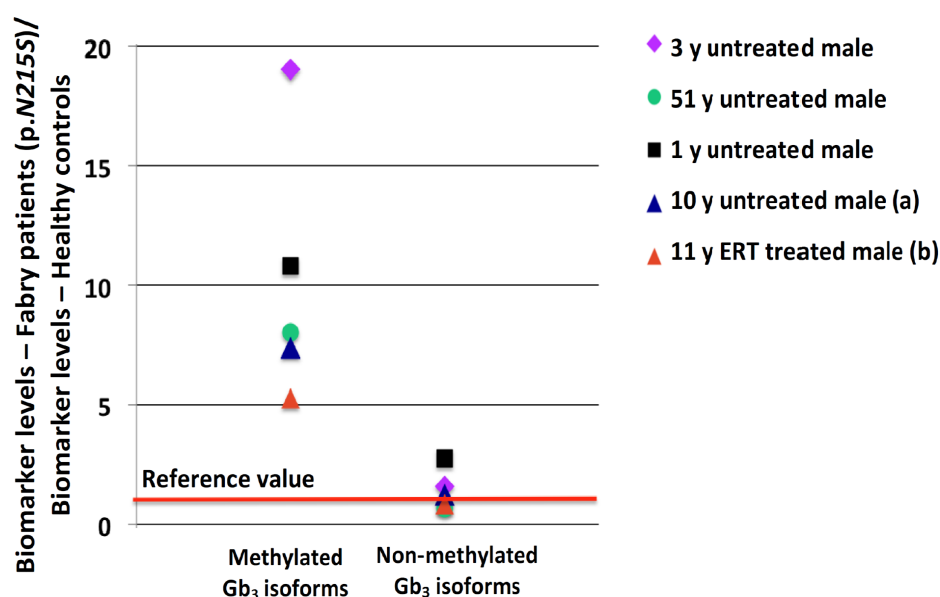


Figure 4. Urine levels of methylated (sum of the 7 measured species) and non-methylated Gb₃ isoforms (sum of the 8 measured species) presented as a ratio to the reference value in one treated and four untreated Fabry males with the p.N215S mutation. (a) and (b) represent the same patient, before and after ERT treatment.

4. Conclusions

A novel UPLC-MS/MS method was developed and validated for the relative quantification of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms. Urinary creatinine was simultaneously analyzed to allow direct sample normalization. A liquid-liquid extraction with methyl tert-butyl ether was devised, and optimized. The tandem mass spectrometry method was also validated prior to analysis of samples. Urinary biomarker levels were evaluated in 150 Fabry patients and 95 age- and gender-matched healthy controls. We found that Fabry patients under study excreted abnormal urinary levels of non-methylated and methylated Gb₃ isoforms. All biomarkers were reduced during ERT. Methylated Gb₃ isoforms were found to be in lower concentration compared to non-methylated Gb₃ isoforms, but in higher concentration than lyso-Gb₃ for the same Fabry patients. Except for the Gb₃(d18:1)(C22:0)Me isoform which was present in trace amounts, methylated Gb₃ isoforms were absent in healthy control urine samples. Relative distribution and abundance of all Gb₃ isoforms were established. Associated methylated and non-methylated Gb₃ isoforms do not present the same relative isoform distribution. Isoforms with long chain fatty acids (C24:0 and C24:1) were the most abundant in the non-methylated Gb₃ group, which was not the case for methylated Gb₃ isoforms, where C22:0 was the most abundant isoform. Biomarkers were analyzed in 5 urine samples from patients with the late-onset cardiac mutation p.N215S where non-methylated urinary Gb₃ isoforms were not highly increased, whereas all these patients presented abnormal levels of methylated Gb₃ isoforms. This excretion profile is similar to the lyso-Gb₃ related analogue profile which was also increased in these same patients [29,31]. These results also support the hypothesis that methylated Gb₃ isoforms are part of the intermediate metabolism pathway between Gb₃ and lyso-Gb₃. The addition of methylated Gb₃ isoforms for Fabry disease screening should be considered for the identification of patients with late-onset mutation having significant residual enzymatic activity. Other investigations with larger cohorts are needed to evaluate correlations with clinical manifestations, and disease severity and progression.

Acknowledgements

This research was funded by a Grant-in-Aid of research from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). We are grateful to Waters Corporation for their continued scientific support and partnership. We would like to thank Dr. Joe T. R. Clarke for his scientific expertise. We would like to acknowledge the dedicated collaboration of colleagues and coordinating-nurses at the Canadian Fabry Disease Initiative. We thank all Fabry patients and healthy reference controls who generously provided urine samples for this study. We would like to thank “La Fondation Pierre Lavoie”, the “Réseau de médecine génétique appliquée” and the “Centre d’Excellence en recherche Mère-Enfant de l’Université de Sherbrooke” for scholarships for Mona Abaoui.

References

- [1] Parenti G, Andria G, Ballabio A. Lysosomal storage diseases: From pathophysiology to therapy. *Annu Rev Med*. 2015;66:471-486.
- [2] Clarke JTR. Narrative review: Fabry disease. *Ann Intern Med*. 2007;146(6):425-433.
- [3] HGMD. Human gene mutation database. <http://www.hgmd.org/>. Updated 2014.
- [4] Bouwman MG, Rombach SM, Schenk E, et al. Prevalence of symptoms in female Fabry disease patients: A case-control survey. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35(5):891-898.
- [5] Fan JQ, Ishii S. Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease. yin and yang of enzyme inhibitors. *FEBS J*. 2007;274(19):4962-4971.
- [6] Platt FM, Jeyakumar M. Substrate reduction therapy. *Acta Paediatr Suppl*. 2008;97(457):88-93.
- [7] Qin G, Takenaka T, Telsch K, et al. Preselective gene therapy for Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(6):3428-3433.
- [8] Schiffmann R. The consequences of genetic and pharmacologic reduction in sphingolipid synthesis. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(1):77-84.
- [9] Pisani A, Visciano B, Roux GD, et al. Enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: State of the art and review of the literature. *Mol Genet Metab*. 2012;107(3):267-275.
- [10] Schiffmann R, Askari H, Timmons M, et al. Weekly enzyme replacement therapy may slow decline of renal function in patients with Fabry disease who are on long-term biweekly dosing. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(5):1576-1583.

- [11] Sirrs S, Clarke JTR, Bichet DG, et al. Baseline characteristics of patients enrolled in the Canadian Fabry Disease Initiative. *Mol Genet Metab*. 2010;99(4):367-373.
- [12] Sirrs S, Bichet DG, Casey R, et al. Outcomes of patients treated through the Canadian Fabry Disease Initiative. *Mol Genet Metab*. 2014;111(4):499-506.
- [13] Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*. 1999;281(3):249-254.
- [14] Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, et al. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet*. 2006;79(1):31-40.
- [15] Hwu WL, Chien YH, Lee NC, et al. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum Mutat*. 2009;30(10):1397-1405.
- [16] Auray-Blais C, Ntwari A, Clarke JTR, et al. How well does urinary lyso-Gb₃ function as a biomarker in Fabry disease? *Clin Chim Acta*. 2010;411(23-24):1906-1914.
- [17] Auray-Blais C, Millington DS, Young SP, Clarke JTR, Schiffmann R. Proposed high-risk screening protocol for Fabry disease in patients with renal and vascular disease. *J Inherit Metab Dis*. 2009;32(2):303-308.
- [18] L. Michaud, C. Auray-Blais. Improved ways to screen for patients with Fabry disease, involving optometry in a multidisciplinary approach. *Canadian Journal of Optometry*. 2012;74(4):25.
- [19] Winchester B, Young E. Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, eds. *Fabry disease: Perspectives from 5 years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006.
- [20] Sweeley CC, Klionsky B. Fabry's disease: Classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid. *J Biol Chem*. 1963;238:3148-3150.
- [21] Mills K, Morris P, Lee P, et al. Measurement of urinary CDH and CTH by tandem mass spectrometry in patients hemizygous and heterozygous for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(1):35-48.
- [22] Boutin M, Auray-Blais C. Metabolomic discovery of novel urinary galabiosylceramide analogs as Fabry disease biomarkers. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2015;26(3):499-510.
- [23] Schiffmann R, Forni S, Swift C, et al. Risk of death in heart disease is associated with elevated urinary globotriaosylceramide. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(1):e000394.
- [24] Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8):2812-2817.

- [25] Boutin M, Gagnon R, Lavoie P, Auray-Blais C. LC-MS/MS analysis of plasma lyso-Gb₃ in Fabry disease. *Clin Chim Acta*. 2012;414:273-280.
- [26] Boutin M, Auray-Blais C. Multiplex tandem mass spectrometry analysis of novel plasma lyso-Gb₃-related analogues in Fabry disease. *Anal Chem*. 2014;86(7):3476-3483.
- [27] Dupont FO, Gagnon R, Boutin M, Auray-Blais C. A metabolomic study reveals novel plasma lyso-Gb₃ analogs as Fabry disease biomarkers. *Curr Med Chem*. 2013;20(2):280-288.
- [28] Auray-Blais C, Boutin M, Gagnon R, Dupont FO, Lavoie P, Clarke JTR. Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics. *Anal Chem*. 2012;84(6):2745-2753.
- [29] Lavoie P, Boutin M, Auray-Blais C. Multiplex analysis of novel urinary lyso-Gb₃-related biomarkers for Fabry disease by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2013;85(3):1743-1752.
- [30] Young E, Mills K, Morris P, et al. Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta Paediatr Suppl*. 2005;94(447):51-4; discussion 37-8.
- [31] Auray-Blais C, Blais CM, Ramaswami U, et al. Urinary biomarker investigation in children with Fabry disease using tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2014;438C:195-204.
- [32] Manwaring V, Boutin M, Auray-Blais C. A metabolomic study to identify new globotriaosylceramide-related biomarkers in the plasma of Fabry disease patients. *Anal Chem*. 2013;85(19):9039-9048.
- [33] Auray-Blais C, Boutin M. Novel Gb₃ isoforms detected in urine of Fabry disease patients: A metabolomic study. *Curr Med Chem*. 2012;19(19):3241-3252.
- [34] Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(12):1694-1699.
- [35] Lohse B, Kristensen JL, Kristensen LH, et al. Inhibitors of histone demethylases. *Bioorg Med Chem*. 2011;19(12):3625-3636.
- [36] Bai HW, Shim JY, Yu J, Zhu BT. Biochemical and molecular modeling studies of the O-methylation of various endogenous and exogenous catechol substrates catalyzed by recombinant human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferases. *Chem Res Toxicol*. 2007;20(10):1409-1425.
- [37] Patti GJ, Yanes O, Shriver L, et al. Metabolomics Implicates Altered Sphingolipids in Chronic Pain of Neuropathic Origin. *Nature Chemical Biology*. 2012;8(3):232-234. doi:10.1038/nchembio.767.

- [38] Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res.* 2008;49(5):1137-1146.
- [39] Auray-Blais C, Millington DS, Barr C, Young SP, Mills K, Clarke JT. Gb₃/creatinine biomarkers for Fabry disease: Issues to consider. *Mol Genet Metab.* 2009;97(3):237.
- [40] Auray-Blais C, Cyr D, Ntwari A, et al. Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease. *Mol Genet Metab.* 2008;93(3):331-340.

Supplementary Information

Figure S-1. Non-methylated Gb₃ isoform abundances (concentration in pmol/mmol creat.) in untreated Fabry males (n=29), treated Fabry males (n=36), healthy control males (n=50), untreated Fabry females (n=53), treated Fabry females (n=32) and healthy control females (n=45). Males are represented by the genetic symbol "♂" and females by "♀". M= mean; minimum and maximum are in brackets. The bold horizontal line is the median. The lower and upper limits shown by the boxplots are the 25th and 75th quartiles. The ends of the whiskers represent the lowest value within 1.5 interquartile range of the 25th quartile and the highest value within 1.5 interquartile range of the 75th quartile. Circles represent outlier values (>1.5 interquartile ranges over the 75th quartile) and asterisks represent extreme values (>3 interquartile ranges over the 75th quartile).

Figure S-2. Relative urinary distribution of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms in: Untreated Fabry males (n=16); Treated Fabry males (n=33); Untreated Fabry females (n=34); Treated Fabry females (n=30); Untreated Fabry children (n=32) and; Treated Fabry children (n=5). Inner circles show non-methylated Gb₃ isoform distributions, and outer circles represent methylated Gb₃ isoform distributions. Methylated and non-methylated Gb₃ isoforms having the same fatty acid moiety share the same color and motif.

Table S-1. Enzyme replacement therapy indications from the Canadian Fabry Disease Treatment Guidelines 2012.

Table S-2. UPLC parameters for the analysis of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms, creatinine and internal standards.

Table S-3. Tandem mass spectrometry parameters for the analysis of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms, creatinine and internal standards.

Table S-4. Interday and intraday precision in control urine samples spiked at low quality control (LQC) and high quality control (HQC) concentrations of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms and creatinine.

Table S-5. Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) for all Gb₃ isoforms (nmol/L) and creatinine (mmol/L).

Table S-6. Raw data from Fabry males, females and children *versus* the urinary excretion of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms (in relation to Figure 3).

Table S-7. Information and biomarker results from Fabry patients and healthy controls who were part of this study (age, gender, treatment, mutation, concentration of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms and lyso-Gb₃).

Figure S-1. Non-methylated Gb₃ isoform abundances (concentration in pmol/mmol creat.) in untreated Fabry males (n=29), treated Fabry males (n=36), healthy male controls (n=50), untreated Fabry females (n= 53), treated Fabry females (n=32) and healthy female controls (n= 45). Males are represented by the genetic symbol "♂" and females by "♀". M=median; minimum and maximum are in brackets. The bold horizontal line is the median. The lower and upper limits shown by the boxplots are the 25th and 75th quartiles. The ends of the whiskers represent the lowest value within 1.5 interquartile range of the 25th quartile and the highest value within 1.5 interquartile range of the 75th quartile. Circles represent outlier values (>1.5 interquartile ranges over the 75th quartile) and asterisks represent extreme values (>3 interquartile ranges over the 75th quartile).

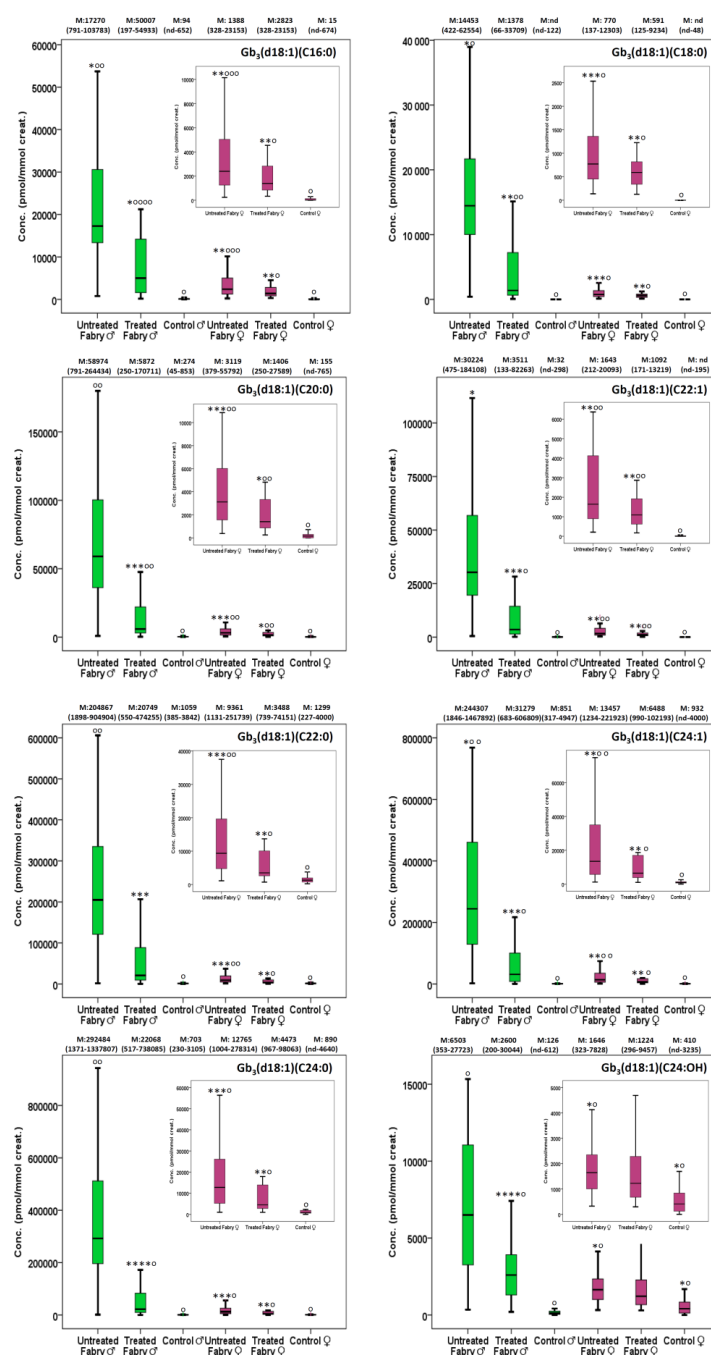


Figure S-2. Relative urinary distribution of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms in: Untreated Fabry males (n=16); Treated Fabry males (n=33); Untreated Fabry females (n=34); Treated Fabry females (n=30); Untreated Fabry children (n=32) and; Treated Fabry children (n=5). Inner circles show non-methylated Gb₃ isoform distributions, and outer circles represent methylated Gb₃ isoform distributions. Methylated and non-methylated Gb₃ isoforms having the same fatty acid moiety share the same color and motif.

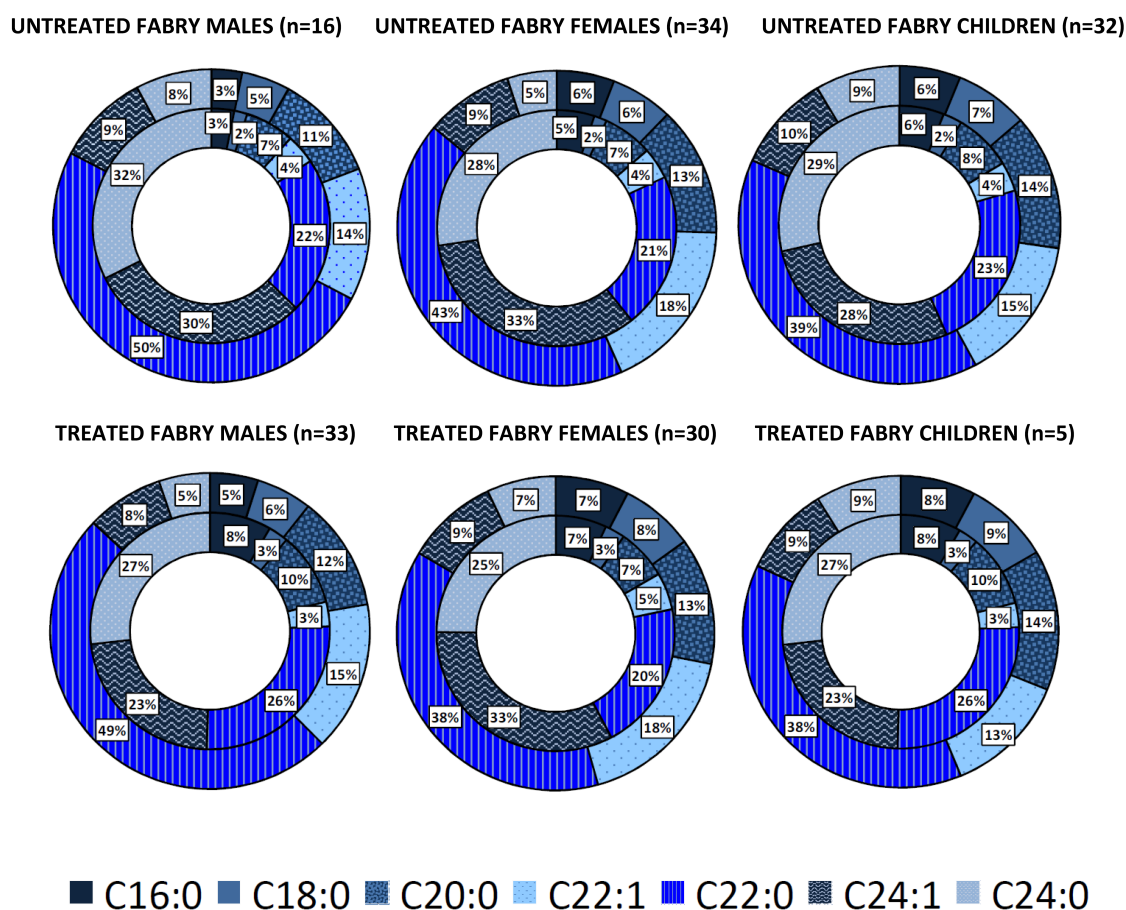


Table S-1. Enzyme replacement therapy indications from the Canadian Fabry Disease Treatment Guidelines 2012

<p>Renal Disease Evidence 1 major criterion or 2 minor criteria</p>	<p>Major criteria</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fabry nephropathy with reduced glomerular filtration rate (GFR): <ul style="list-style-type: none"> - For GFR < 60 ml/min/1.73 m²: chronic kidney disease (CKD) stages 3-5; at least 2 consistent estimates or measurements of GFR over a minimum of 2 months - For GFR 60-90 ml/min/1.73 m²: CKD stage 2; at least 3 consistent estimates or measurements of GFR over at least 4 months with a GFR slope greater than age-related normal - For GFR > 135 ml/min/1.73 m²: a 15% decrease in GFR or a GFR slope greater than age-related normal as measured by nuclear medicine technique. Estimated GFR is not accurate in this range and thus cannot be used. • GFR in adults should be estimated (eGFR) by CKD-EPI formula and in children by other the new Schwartz formula or Comabau-Barret formula. Measured GFR by nuclear medicine technique should be done in adults or children if there is hyperfiltration or inconsistency in renal function. All other methods of estimating GFR such as the MDRD, Cockcroft and Gault or old Schwartz formulas or creatinine clearance are less accurate and should not be used. In particular, these estimates may result in false estimates of GFR. • Persisting proteinuria of 500 mg/day/1.73 m² or greater without other cause. 	<p>Minor criteria</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hyperfiltration: GFR ≥ 135 ml/min/1.73 m². There should be at least two consistent measurements of GFR by nuclear medicine technique at least one month apart when GFR reaches or exceeds 135 ml/min/1.73 m². • Renal tubular dysfunction. Fanconi syndrome and/or nephrogenic diabetes insipidus confirmed usually with abnormal water deprivation test and resistance to DDAVP. • Hypertension • Renal pathology may be taken into account if a renal biopsy is performed but this procedure is not mandatory. If a renal biopsy is done, the presence of glomerular sclerosis, tubulointerstitial atrophy and fibrosis or vascular sclerosis should be considered a minor criterion.
<p>Cardiac Disease Evidence 2 criteria</p>	<p>Criteria</p> <p>Many of the cardiac manifestations may be influenced by the presence of hypertension. In the event of significant hypertension, adequate control of hypertension for a 12 month period should be considered first. Given the development of cardiac fibrosis with late enhancement on cardiac MRI but normal left ventricular (LV) wall thickness (<12 mm) in a significant fraction of Fabry female heterozygotes, a lower threshold of ≥ 1 mm is recommended as a criteria for ERT in this group. The identification of LV wall abnormalities by cardiac tissue Doppler imaging is an important feature of Fabry cardiomyopathy as this can be corrected by ERT prior to the development of cardiac fibrosis.</p> <ul style="list-style-type: none"> • LV wall thickness ≥ 12 mm in males and > 11 mm in females. • LV hypertrophy (LVH) by Estes ECG score must be greater than 5. • LV mass index by 2D echo 20% above normal for age. • Diastolic filling abnormalities by 2D echocardiogram or by other accepted measures of diastolic filling. E/A ratio > 2.0 and deceleration time < 140 msec. • Increase of LV mass of at least 5g/m²/year, with three measurements over a minimum of 12 months. • Abnormal tissue doppler imaging of LV wall with abnormal radial and/or longitudinal strain rate. • Increased LA size on 2D echo. In parasternal long-axis view (PLAX) > 33 mm; in four chamber view $> 10\%$ of the upper limit of normal for the lab. • Abnormalities on cardiac MRI including late enhancement, LV block, short T1 interval, LBBB, ventricular or atrial tachycardia/arrhythmias, sinus bradycardia (in the absence of drugs with negative chronotropic activity or other causes). • Moderate to severe mitral or aortic insufficiency. • Late enhancement of left ventricular wall on MRI. As women are now recognized to develop left ventricular fibrosis in the absence of LVH, regular cardiac MRI may be preferred to echocardiogram in some women. 	<p>All other causes of these renal features need to be excluded. When reduction of GFR is present, the negative effects on GFR by concurrent medications such as ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers, diuretics, non-steroidal anti-inflammatory drugs and other agents should be excluded. A nephrology consultation may need to be obtained. Consideration should be given to a renal biopsy if there is any doubt as to the diagnosis.</p>
<p>Neurologic Disease Evidence 1 major criterion</p>	<p>Major criteria</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stroke or TIA documented by a neurologist • Seizures • Acute ischemic optic neuropathy when all other possible causes have been eliminated <p>The direct evidence of benefit of ERT for neurological disease alone is weak. However, the presence of serious neurological disease (stroke, TIA, acute hearing loss) often with irreversible CNS damage indicates severe Fabry disease. The possible beneficial impact of ERT in severe Fabry disease warrants consideration of initiating treatment. Imaging abnormalities (white matter lesions, dolichoectasia, cerebral microbleeds) on their own are not an indication for enzyme replacement as their clinical significance remains unclear. Anti-platelet treatment with ASA and other drugs e.g. clopidogrel should be the mainstay of treatment unless contraindicated. Drugs that are associated with an increased risk of stroke, e.g. birth control agents, may also theoretically increase the risk of stroke in Fabry patients. This possibility should be considered when selecting a method of birth control.</p>	<p>All other causes of these cardiac features need to be excluded. A cardiologist may need to be consulted. Consideration should be given to a left ventricular biopsy if there is any doubt as to the diagnosis. Atypical chest pain in the absence of LVH may indicate the presence of small vessel disease and patients should undergo specific investigation including cardiac perfusion PET scan.</p>
<p>Neuropathic Pain Evidence 1 major criterion</p>	<p>• Intractable pain refractory to other therapies. This requires a prior treatment course of at least six months at adequate dose with medication(s) for neuropathic pain such as phenytoin, carbamazepine, gabapentin, pregabalin, amitriptyline or duloxetine.</p>	<p>• Significant gastrointestinal symptoms unresponsive to other measures for at least six months or associated with poor growth or significant reduction in quality of life.</p>

Table S-2. UPLC parameters for the analysis of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms, creatinine and internal standards.

UPLC method	
Column	Acquity UPLC CSH C18
i.d. x length	2.1 mm x 50 mm
Particle size	1.7 μ m
Temperature	30°C
Flow rate	0.25 ml/min
Mobile phase A	MeOH/Amm. For. 5mM/FA 0.1%
Mobile phase B	H ₂ O/MeOH 5%/Amm. For. 5mM/FA 0.1%
Gradient	0.0-0.5 min → 50%A
	0.5-3.0 min → 50%-80%A (linear)
	3.0-6.5 min → 80%-100%A (linear)
	6.5-9.5 min → 100%A
	9.5-10.5 min → 100%-50%A (linear)
	10.5-12.0 min → 50%A
Strong wash	MeOH/FA 0.1%
Weak wash	50% PhaseA/50% PhaseB
Injection volume	5 μ l
Injection mode	Partial loop
Autosampler temperature	20°C

Table S-3. Tandem mass spectrometry parameters for the analysis of methylated and non-methylated Gb₃ isoforms, creatinine and internal standards.

MS-MS method		Acquisition parameters	
Operating mode	Multiple reaction monitoring	Dwell time	0.080 s
Ionisation mode	ESI+	Cone voltage	30 V
Capillary voltage	3.2 kV	Collision energy	30 V
Source offset	60 V		
Desolvation temperature	400 °C		
Cone gas flow	150 L/h		
Desolvation gas flow	550 L/h		
Nebuliser	4 Bar		
MRM transitions and UPLC retention times			
Compounds	Precursor ions (<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>)	Retention times (min)
(d18:1)(C16:0)Me*	1038.7	534.6	7.90
(d18:1)(C18:0)Me	1066.7	562.6	8.27
(d18:1)(C20:0)Me	1094.7	590.7	8.76
(d18:1)(C22:1)Me	1120.8	616.7	8.80
(d18:1)(C22:0)Me	1122.8	618.7	9.36
(d18:1)(C24:1)Me	1148.8	644.7	9.27
(d18:1)(C24:0)Me	1150.8	646.7	10.00
(d18:1)(C16:0)	1024.7	520.6	7.72
(d18:1)(C18:0)	1052.7	548.6	8.09
(d18:1)(C20:0)	1080.8	576.7	8.51
(d18:1)(C22:1)	1106.8	602.7	8.58
(d18:1)(C22:0)	1108.8	604.7	9.05
(d18:1)(C24:1)	1134.8	630.7	9.09
(d18:1)(C24:0)	1136.8	632.7	9.73
(d18:1)(C24:OH)	1152.7	648.6	8.71
(d18:1)(C17:0) (calibration STD)*	1038.7	534.6	7.79
(d18:1)(C18:0)D3 (IS)	1055.7	551.6	8.09
Creatinine	114.1	43.9	0.50
Creatinine-D3 (IS)	117.1	46.9	0.50

* Gb₃(d18:1)(C16:0)Me in samples and Gb₃(d18:1)(C17:0) in the calibration curve were analyzed using the same MRM transitions

Table S-4. Interday and intraday precision assays in control urine samples spiked at low quality control (LQC) and high quality control (HQC).

	Methylated and non methylated Gb₃ isoforms (n=15)	
	LQC	HQC
Intraday	18%	12%
Interday	18%	17%
	Creatinine (n=2)	
	LQC	HQC
Intraday	6%	2%
Interday	5%	4%

Table S-5. Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) for all Gb₃ isoforms (nmol/L) and creatinine (mmol/L).

Gb ₃ isoforms	LOD	LOQ
(d18:1)(C16:0)Me	0.4	1.3
(d18:1)(C18:0)Me	0.5	1.5
(d18:1)(C20:0)Me	0.7	2.5
(d18:1)(C22:1)Me	0.5	1.5
(d18:1)(C22:0)Me	1.1	3.7
(d18:1)(C24:1)Me	0.6	2.2
(d18:1)(C24:0)Me	0.5	1.8
(d18:1)(C16:0)	3.1	10.3
(d18:1)(C18:0)	0.6	2.2
(d18:1)(C20:0)	1.0	3.3
(d18:1)(C22:1)	0.6	2.0
(d18:1)(C22:0)	1.6	5.3
(d18:1)(C24:1)	2.2	7.5
(d18:1)(C24:0)	3.8	12.7
(d18:1)(C24:OH)	1.5	5.0
Creatinine	0.07	0.22

Table S-6. Raw data from Fabry males, females and children versus the urinary excretion of methylated and non-methylated Gb3 isoforms (in relation to Figure 3).

GENDER : MALE

TREATMENT : NO

AGE : ADULT

	Methylated Gb, isoforms								Non-methylated Gb, isoforms								
	1038	1066	1094	1120	1122	1148	1150	Met totaux	1024	1052	1080	1106	1108	1134	1136	1152	NonMet Tot
N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
MEDIAN	2646	4753	10710	12768	48574	10316	8881	102850	19865	15602	66125	36018	227412	301455	345024	6558	1009206
STDEV	2531	3321	8094	12577	49043	8435	6567	86054	25049	14688	63157	43120	224895	347382	338716	6607	1054970
TOTAL	47732	79553	194532	253153	1026016	178499	140765	1920250	447491	299214	1257382	775206	4272215	5910048	6543380	129461	19634397
MIN	160	160	257	353	481	225	160	1796	1700	449	994	738	2438	5613	2662	353	14948
MAX	10734	13719	28718	45920	169844	32414	23884	289029	103783	62554	264434	184108	904904	1467892	1337807	27723	4353205

GENDER : MALE

TREATMENT : YES

AGE : ADULT

	Methylated Gb ₃ isoforms								Non-methylated Gb ₃ isoforms								
	1038	1066	1094	1120	1122	1148	1150	Total Met.	1024	1052	1080	1106	1108	1134	1136	1152	Total Non-Met.
N	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
MEDIAN	406	429	859	1275	3860	581	445	7906	5582	1633	7253	4671	22809	35021	23687	2760	106221
STDEV	3353	5838	14754	18186	82515	12517	6093	142099	15129	10364	45157	22361	127227	161765	189331	6489	567378
TOTAL	48589	75623	175809	218259	935768	140385	78890	1673323	395349	227691	889956	471647	2638397	3484446	3585460	157976	11850923
MIN	nd	nd	nd	nd	164	nd	nd	164	197	66	528	197	1480	1541	1480	220	6393
MAX	18061	31916	82510	101159	418985	69552	33400	755583	54933	33709	170711	82263	474255	606809	738085	30044	2155532

GENDER : FEMALE

TREATMENT : NO

AGE : ADULT

	Methylated Gb, isoforms								Non-methylated Gb, isoforms								
	1038	1066	1094	1120	1122	1148	1150	Total Met.	1024	1052	1080	1106	1108	1134	1136	1152	Total Non-Met.
N	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34
MEDIAN	312	367	748	1049	2591	493	248	5725	4095	941	4644	3217	17201	23862	19538	1867	77643
STDEV	387	556	1311	1388	5500	763	354	10066	4910	2317	10700	4477	44149	48400	50563	1505	162228
TOTAL	14913	17519	37785	49317	129602	25183	11956	286276	180981	56525	277587	154627	939577	1384739	1178794	77348	4250177
MIN	19	38	74	62	223	37	62	546	435	174	447	286	1391	1875	1626	557	7251
MAX	1845	2892	7429	6980	32159	3839	2044	57188	20692	12303	55792	20093	251739	221923	278314	7828	860569

GENDER : FEMALE

TREATMENT : YES

AGE : ADULT

	Methylated Gb ₃ isoforms								Non-methylated Gb ₃ isoforms								
	1038	1066	1094	1120	1122	1148	1150	Total Met.	1024	1052	1080	1106	1108	1134	1136	1152	Total Non-Met.
N	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
MEDIAN	212	188	325	484	707	228	183	2175	1367	591	1406	1132	3488	6488	4473	1177	22287
STDEV	278	344	741	843	2711	420	299	5291	4623	1638	5200	2808	15386	25612	21756	1901	73780
TOTAL	8606	9128	17622	22848	56346	12085	7944	134580	88067	29773	96564	64734	302378	514236	405946	56732	1558430
MIN	29	36	80	102	171	68	36	603	328	125	250	171	739	990	967	296	3970
MAX	1196	1656	3733	3312	11760	1435	1196	23463	23153	9234	27589	13219	74151	102193	98063	9457	304491

GENDER : MALE

TREATMENT : NO

AGE : CHILDREN

	Methylated Gb ₃ isoforms								Non-methylated Gb ₃ isoforms								
	1038	1066	1094	1120	1122	1148	1150	Total Met.	1024	1052	1080	1106	1108	1134	1136	1152	Total Non-Met.
N	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
MEDIAN	917	1481	4070	4586	16613	2897	2296	32225	16585	10530	56075	23430	195067	211398	235554	6503	773462
STDEV	1836	1970	5277	8202	23727	4184	2634	47307	23823	14681	65084	35028	224954	417650	373561	4709	1150312
TOTAL	19073	27573	74270	92817	305284	54888	38741	612645	312942	203043	883898	446456	3057045	4662222	4871907	92209	14529724
MIN	144	202	316	316	422	260	231	2056	791	422	791	475	1898	1846	1371	475	8067
MAX	6950	7424	17237	29324	85367	15827	10388	172518	77698	49496	207770	111655	725180	1324892	1150360	15338	3654245

GENDER : MALE

TREATMENT : YES

AGE : CHILDREN

	Methylated Gb ₃ isoforms								Non-methylated Gb ₃ isoforms								
	1038	1066	1094	1120	1122	1148	1150	Total Met.	1024	1052	1080	1106	1108	1134	1136	1152	Total Non-Met.
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MEDIAN	121	217	556	338	1667	217	193	3310	1715	773	3843	894	10606	6668	10365	676	36120
STDEV	200	178	358	301	1022	226	229	2430	1121	598	2260	720	6710	5348	8471	1481	26108
TOTAL	624	737	1425	1137	3913	825	801	9462	4565	2200	8514	2599	24431	18705	28261	3846	93122
MIN	67	83	83	100	150	83	83	650	317	117	250	133	550	683	517	200	2766
MAX	437	437	786	699	2096	524	524	5502	2533	1310	4421	1572	13275	11354	17380	2969	54236

GENDER : FEMALE

TREATMENT : NO

AGE : CHILDREN

	Methylated Gb ₃ isoforms								Non-methylated Gb ₃ isoforms								
	1038	1066	1094	1120	1122	1148	1150	Total Met.	1024	1052	1080	1106	1108	1134	1136	1152	Total Non-Met.
N	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
MEDIAN	168	153	361	361	900	201	167	2480	1424	515	1799	888	4762	4762	5248	1083	23810
STDEV	198	242	292	372	758	255	232	2128	2016	529	1852	1023	4953	8035	5843	903	24087
TOTAL	4009	4551	7659	8383	19642	5424	4559	54226	38483	12763	40950	20778	115074	147419	128423	25329	529219
MIN	34	51	86	69	190	51	51	548	240	137	379	212	1131	1234	1004	323	5320
MAX	907	1134	1134	1573	2849	1134	1134	8163	9370	2290	7359	4598	17673	35032	20820	3477	98470

GENDER : FEMALE

TREATMENT : YES

AGE : CHILDREN

	Methylated Gb ₃ isoforms								Non-methylated Gb ₃ isoforms								
	1038	1066	1094	1120	1122	1148	1150	Total Met.	1024	1052	1080	1106	1108	1134	1136	1152	Total Non-Met.
N	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
MEDIAN	231	231	431	361	1247	248	214	2963	2365	544	2952	731	7840	6290	8062	1455	30238
STDEV	16	16	175	77	833	41	8	1150	1359	211	2438	289	6744	4429	7555	1127	24151
TOTAL	462	462	861	723	2494	496	427	5925	4729	1088	5904	1462	15679	12580	16125	2910	60476
MIN	219	219	307	307	658	219	208	2150	1404	395	1228	526	3071	3159	2720	658	13161
MAX	242	242	554	416	1836	277	219	3776	3325	693	4676	935	12608	9422	13405	2251	47316

DISCUSSION

La spectrométrie de masse est une technologie de choix dans le domaine analytique. Elle offre plusieurs avantages majeurs qui sont importants dans le domaine de la santé tels, celui de quantifier dans une même analyse plusieurs molécules, de façon rapide et robuste et le fait que la quantité d'échantillon de départ requise est souvent minime, favoriser l'implantation de la technologie dans les analyses de routine en biochimie génétique. De plus, la sélectivité et la sensibilité que permettent d'atteindre les analyses par spectrométrie de masse, en utilisant, par exemple, un analyseur quadripolaire, sont des atouts majeurs. Certains inconvénients accompagnent toutefois l'implantation de la technologie, notamment le coût nécessaire à l'achat de l'équipement. Par ailleurs, ce coût peut être amorti assez rapidement selon le nombre d'analyses faites.

Le développement d'une méthode de quantification pour les isoformes méthylés du Gb₃, un groupe de biomarqueurs nouvellement identifiés en 2012 suite à une étude métabolomique, a été effectué. Une nouvelle méthode urinaire a été développée et validée pour permettre l'analyse simultanée des isoformes méthylés, des isoformes non-méthylés du Gb₃, ainsi que de la créatinine urinaire qui permet de normaliser les échantillons. Une comparaison a pu être établie entre le dosage relatif des deux groupes de biomarqueurs, soit les isoformes méthylés et les non-méthylés du Gb₃. Suite au développement et à la validation de la méthode, le dosage des biomarqueurs a pu être effectué auprès d'une large cohorte de patients Fabry et de contrôles sains, afin de comparer les niveaux de métabolites urinaires et d'évaluer si des corrélations avec le génotype, l'âge et le sexe des patients pouvaient être observées. De plus, les valeurs de référence chez des contrôles sains ont pu être déterminées. Cette étude a aussi permis d'évaluer la pertinence d'ajouter ces biomarqueurs à l'analyse de routine permettant le suivi des patients atteints de la maladie Fabry.

L'analyse du niveau de biomarqueurs urinaires chez plus de 150 patients a premièrement montré les abondances relatives des isoformes méthylés par rapport aux autres groupes de

biomarqueurs. Les isoformes méthylés du Gb₃ sont 10 fois moins abondants que les isoformes non-méthylés du Gb₃, mais près de 200 fois plus abondants que le lyso-Gb₃. Les isoformes aux chaînes de carbone de longueurs intermédiaires (C18:0-C22:0) semblent plus abondants que ceux à chaînes courtes et longues (C16:0, C24:0 et C24:1). Certaines caractéristiques générales ont aussi pu être étudiées, montrant que l'abondance de ce nouveau groupe de biomarqueurs chez les hommes et les femmes traités et non traités suivait la même tendance que pour les autres groupes de biomarqueurs, tels le Gb₃ et le lyso-Gb₃. L'analyse de biomarqueurs dans l'urine de 5 patients avant et après thérapie enzymatique de remplacement a aussi pu montrer l'impact de la TER sur les isoformes méthylés du Gb₃, faisant de ceux-ci des biomarqueurs intéressants pour le monitoring de la maladie.

L'un des objectifs secondaires de l'étude visait à évaluer si des corrélations pouvaient être établies entre l'excrétion urinaire des biomarqueurs et le génotype des patients. L'analyse de spécimens de 5 patients portant la mutation *p.N215S* été effectuée. Cette mutation est à l'origine d'une forme tardive de la maladie de Fabry, pour laquelle les patients présentent principalement des symptômes cardiaques et une activité enzymatique résiduelle. La particularité de cette mutation vient du fait que les patients présentent habituellement des niveaux normaux d'isoformes non-méthylés du Gb₃ et du lyso-Gb₃. Toutefois, une étude a montré que les différents analogues du lyso-Gb₃ sont augmentés chez ces patients. L'interrogation concernant la présence ou non des isoformes méthylés du Gb₃ chez les patients présentant cette variante cardiaque de la maladie s'est donc posée. L'analyse de 6 échantillons urinaires provenant desdits patients a montré des niveaux anormaux d'isoformes méthylés du Gb₃ chez la totalité de ceux-ci. Cette découverte est encourageante et permet d'envisager une amélioration du rendement du dépistage à haut risque des patients présentant des mutations où une activité enzymatique résiduelle mène à un niveau normal d'excrétion de certains biomarqueurs habituellement dosés, tels le Gb₃ et le lyso-Gb₃. L'ajout de biomarqueurs montrant des niveaux anormaux d'excrétion urinaire chez les patients présentant une variante cardiaque de la maladie de Fabry permet de réduire le risque de faux-négatifs et d'ajouter de la puissance à la méthode de dépistage. Il est fortement suggéré que plusieurs projets de recherche visant le dépistage à haut risque de la

maladie de Fabry devraient ajouter ces biomarqueurs à la liste de ceux existant afin d'évaluer un "profil personnalisé" de biomarqueurs et ce, considérant la grande hétérogénéité phénotypique et génotypique de ladite maladie.

CONCLUSIONS

Les objectifs de cette étude étaient : 1) de développer et de valider une méthode d'analyse quantitative des isoformes méthylés et non-méthylés du Gb₃ et de la créatinine urinaire par spectrométrie de masse en tandem; 2) de doser les biomarqueurs sur une large cohorte de patients atteints de la maladie de Fabry et de contrôles sains; 3) de comparer la concentration des isoformes méthylés du Gb₃ urinaire avec la concentration des isoformes non-méthylés du Gb₃; et 4) de déterminer s'il existe des corrélations entre les biomarqueurs quantifiés de façon relative avec l'âge, le sexe, le traitement et le génotype des patients.

Une méthode de quantification permettant l'analyse des isoformes méthylés et non-méthylés du Gb₃ et de la créatinine urinaire a été développée en utilisant un spectromètre de masse en tandem Xevo-TQS couplé à un système de chromatographie en phase liquide à ultra performance ACQUITY UPLC I-Class. Une extraction liquide-liquide à l'aide du méthyl tert-butyl éther, de méthanol et d'eau a préalablement été développée afin de permettre une purification des échantillons urinaires avant l'injection dans l'appareil. Au total, les spécimens d'urine de 150 patients atteints de la maladie de Fabry et de 95 contrôles sains ont été analysés et les concentrations pour 15 biomarqueurs (isoformes méthylés et non-méthylés du Gb₃) ont pu être déterminées. La créatinine urinaire a été analysée simultanément pour permettre la normalisation des échantillons. Nos résultats montrent que les contrôles sains n'excrètent pas de biomarqueurs évalués dans cette étude, à l'exception de l'isoforme Gb₃(d18:1)(C22:0)Me qui est présent à l'état de trace chez certains contrôles. Les valeurs de référence pour ce nouveau groupe de biomarqueurs ont pu être établies. Les variations entre les niveaux d'excrétion urinaire de l'ensemble des métabolites chez les hommes, les femmes, les enfants, ainsi que les patients avec et sans TER ont été évalués. Nos résultats montrent que les patients Fabry qui présentent des niveaux élevés de métabolites urinaires montrent tous une diminution marquée des isoformes méthylés du Gb₃ lorsqu'ils sont soumis à la TER, permettant de valider l'utilisation de ce groupe de biomarqueurs pour le suivi des patients sous TER. Il a aussi pu être démontré que les hommes excrètent plus d'isoformes méthylés du Gb₃ que les femmes, tel qu'observé pour les isoformes non-méthylés du Gb₃.

L'analyse des biomarqueurs chez 5 patients portant la mutation à variante cardiaque p.N215S a permis d'observer des niveaux anormaux d'isoformes méthylés du Gb₃. Tel que rapporté dans la littérature, les niveaux d'isoformes non-méthylés du Gb₃ et de lyso-Gb₃ sont souvent normaux chez les patients présentant une variante cardiaque de la maladie, ce qui réduit considérablement l'efficacité du dépistage de celle-ci et peut même mener à des faux-négatifs (Auray-Blais *et al.*, 2014). Ces avancées permettent de mieux comprendre l'importance des isoformes méthylés du Gb₃, en particulier, chez ceux qui présentent la variante cardiaque de la maladie de Fabry et de pouvoir juger de la pertinence d'inclure la quantification de ces biomarqueurs dans les investigations de routine auprès des patients.

Idéalement, il serait intéressant de pouvoir développer une méthode de quantification qui permettrait l'analyse simultanée de tous les biomarqueurs jugés pertinents et informatifs pour la maladie de Fabry. Avec les avancées en spectrométrie de masse au cours des dernières années, il est maintenant possible de développer des méthodes permettant l'analyse d'une multitude de molécules dans une même injection, tel que démontré dans cette étude. Toutefois, certaines molécules ne peuvent être analysées par une seule méthode dues à leurs caractéristiques et structures chimiques et aux méthodes d'extraction permettant la purification des échantillons qui diffèrent considérablement (ex. Gb₃ et lyso-Gb₃). Toutefois, les isoformes méthylés et non-méthylés du Gb₃ peuvent être analysés et extraits conjointement tel que démontré dans cette étude.

Certes, l'étude métabolomique effectuée en 2012 a aussi mis en évidence la présence de 4 autres groupes d'isoformes et d'analogues du Gb₃ qui pourraient se prêter à une analyse plus approfondie afin d'évaluer si leur intégration à la méthode d'analyse actuelle serait pertinente. Il serait aussi intéressant d'investiguer davantage ces différents biomarqueurs dans le cadre d'un volet métabolique et cellulaire.

Ultimement, le développement de méthodes d'analyses simultanées de plusieurs biomarqueurs spécifiques à la maladie de Fabry pourrait mener à l'obtention d'un "profil personnalisé" de biomarqueurs pour chacun des patients. Advenant que certains

biomarqueurs soient spécifiques à certaines manifestations cliniques de la maladie, l'élaboration d'un profil-type pourrait aider les professionnels de la santé à mieux établir le pronostic des patients et à orienter le suivi et le traitement de la maladie en fonction des symptômes pour lesquelles le patient est à risque. Des études supplémentaires devront être effectuées pour évaluer la pertinence des différents groupes de biomarqueurs et évaluer si des corrélations peuvent être établies avec les manifestations cliniques, la sévérité de la maladie et le génotype des patients atteints de la maladie de Fabry.

Parmi les perspectives futures, celle du développement d'une méthode où les analyses seraient faites à partir de l'urine prélevée sur un papier filtre serait envisageable, car cela pourrait faciliter la collecte, le transport par la poste et l'entreposage des échantillons d'urine. De plus, il serait souhaitable de quantifier les isoformes méthylés du Gb₃ au niveau sanguin afin d'en faire la comparaison avec l'excrétion au niveau urinaire. Finalement, il serait intéressant d'accroître les connaissances sur le métabolisme des isoformes méthylés et non-méthylés du Gb₃, en effectuant des investigations au niveau cellulaire et moléculaire.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Christiane Auray-Blais, ma directrice de maîtrise. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné cette chance. Merci pour le support, les encouragements, le soutien tant académique que personnel. Mes deux années de maîtrise ont été remplies de belles opportunités, de beaux moments et d'accomplissements. J'en sort grandi et ceci, principalement grâce à ta générosité et à ton encadrement.

Je tiens à remercier mes proches, mes parents et ma soeur pour leur soutien et leur encouragement. Vous êtes essentiels à ma réussite et à mon épanouissement.

Merci à l'équipe du laboratoire de spectrométrie de masse, Michel, Mélanie et Pamela, pour votre accueil, votre patience et vos apprentissages. Tout ceci n'aurait pas été possible sans vous. Vous m'avez beaucoup appris et travailler à vos côtés fut un réel plaisir.

Merci à M. Joe T.R. Clarke et à M. Darel Hunting d'avoir gentiment accepté de réviser mon mémoire. Je voudrais également remercier tous les membres du service de génétique et du département de médecine nucléaire et de radiobiologie.

Merci au Réseau de Médecine Génétique Appliquée, à la Fondation du Grand Défi Pierre Lavoie, à l'Axe Mère-Enfant du CHUS, aux Caisses Populaires Desjardins, à nos partenaires des compagnies Waters Corporation, Genzyme, une division Sanofi et Shire.

Dernièrement, j'aimerais remercier les patients atteints de la maladie de Fabry pour leur collaboration et souligner leur courage.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Aerts, J. M., Groener, J. E., Kuiper, S., Donker-Koopman, W. E., Strijland, A., Ottenhoff, R., van Roomen, C., Mirzaian, M., Wijburg, F. A., Linthorst, G. E., Vedder, A. C., Rombach, S. M., Cox-Brinkman, J., Somerharju, P., Boot, R. G., Hollak, C. E., Brady, R. O. et Poorthuis, B. J. (2008). Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 105, numéro 8, p. 2812-2817.
- Auray-Blais, C., Blais, C. M., Ramaswami, U., Boutin, M., Germain, D. P., Dyack, S., Bodamer, O., Pintos-Morell, G., Clarke, J. T., Bichet, D. G., Warnock, D. G., Echevarria, L., West, M. L. et Lavoie, P. (2014). Urinary biomarker investigation in children with Fabry disease using tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, volume 438, p. 195-204.
- Auray-Blais, C., et Boutin, M. (2012). Novel Gb₃ isoforms detected in urine of Fabry disease patients: a metabolomic study. *Current Medicinal Chemistry*, volume 19, numéro 19, p. 3241-3252.
- Auray-Blais, C., Boutin, M., Gagnon, R., Dupont, F. O., Lavoie, P. et Clarke, J. T. (2012). Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics. *Analytical Chemistry*, volume 84, numéro 6, p. 2745-2753.
- Auray-Blais, C., Boutin, M., Lavoie, P., Casey, R., Clarke, J.T.R., Foley, S.R., Keating, A., Khan, A., West, M., Medin, J. (2013) Gene Therapy for Fabry Disease Patients: The Importance of Efficient Biomarker Monitoring, *Molecular Genetics and Metabolism*, volume 108, numéro 2, p. S21.
- Auray-Blais, C., Cyr, D., Ntwari, A., West, M. L., Cox-Brinkman, J., Bichet, D. G., Germain, D. P., Laframboise, R., Melancon, S. B., Stockley, T., Clarke, J. T. et Drouin, R. (2008). Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, volume 93, numéro 3, p. 331-340.
- Auray-Blais, C., Millington, D. S., Barr, C., Young, S. P., Mills, K. et Clarke, J. T. (2009). Gb₃/creatinine biomarkers for Fabry disease: issues to consider. *Molecular Genetics and Metabolism*, volume 97, numéro 3, p. 237.
- Auray-Blais, C., Ntwari, A., Clarke, J. T., Warnock, D. G., Oliveira, J. P., Young, S. P., Millington, D. S., Bichet, D. G., Sirrs, S., West, M. L., Casey, R., Hwu, W. L., Keutzer, J. M., Zhang, X. K. et Gagnon, R. (2010). How well does urinary lyso-Gb₃ function as a biomarker in Fabry disease? *Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry*, volume 411, numéro 23-24, p. 1906-1914.

- Bai, H. W., Shim, J. Y., Yu, J., et Zhu, B. T. (2007). Biochemical and molecular modeling studies of the O-methylation of various endogenous and exogenous catechol substrates catalyzed by recombinant human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferases. *Chemical Research in Toxicology*, volume 20, numéro 10, p. 1409-1425.
- Barton, N. W., Brady, R. O., Dambrosia, J. M., Di Bisceglie, A. M., Doppelt, S. H., Hill, S. C., Mankin H.J., Murray G.J., Parker R.I., Argoff C.E., *et al.* (1991). Replacement therapy for inherited enzyme deficiency—macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *New England Journal of Medicine*, volume 324, numéro 21, p. 1464-1470.
- Biffi, A., Montini, E., Lorioli, L., Cesani, M., Fumagalli, F., Plati, T., Baldoli, C., Martino, S., Calabria, A., Canale, S., Benedicenti, F., Vallanti, G., Biasco, L., Leo, S., Kabbara, N., Zanetti, G., Rizzo, W. B., Mehta, N. A., Cicalese, M. P., Casiraghi, M., Boelens, J. J., Del Carro, U., Dow, D. J., Schmidt, M., Assanelli, A., Neduva, V., Di Serio, C., Stupka, E., Gardner, J., von Kalle, C., Bordignon, C., Ciceri, F., Rovelli, A., Roncarolo, M. G., Aiuti, A., Sessa, M. et Naldini, L. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*, volume 341, numéro 6148, p. 1233-1238.
- Boutin, M. et Auray-Blais, C. (2014). Multiplex tandem mass spectrometry analysis of novel plasma lyso-Gb₃-related analogues in Fabry disease. *Analytical Chemistry*, volume 86, numéro 7, p. 3476-3483.
- Boutin, M. et Auray-Blais, C. (2015). Metabolomic discovery of novel urinary galabiosylceramide analogs as Fabry disease biomarkers. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, volume 26, numéro 3, p. 499-510.
- Boutin, M., Gagnon, R., Lavoie, P., et Auray-Blais, C. (2012). LC-MS/MS analysis of plasma lyso-Gb₃ in Fabry disease. *Clinica Chimica Acta*, volume 414, p. 273-280.
- Bouwman, M. G., Rombach, S. M., Schenk, E., Sweeb, A., Wijburg, F. A., Hollak, C. E., et Linthorst, G. E. (2012). Prevalence of symptoms in female Fabry disease patients: a case-control survey. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, volume 35, numéro 5, p. 891-898.
- Brunetti-Pierri, N., Parenti, G., et Andria, G. (2012). Inborn Errors of Metabolism. *Neonatology*, p. 949-966.
- Buda, P., Wieteska-Klimczak, A., Ksiazek, J., Gietka, P., Smorzewska-Kiljan, A., Pronicki, M., Czartoryska, B., et Tylki-Szymanska, A. (2012). Gastrointestinal phenotype of Fabry disease in a patient with pseudoobstruction syndrome. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, volume 4, p. 25-28.

- Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., Sawyer, B. G., et Tietz, N. W., (2008). *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. Saunders/Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Capotondo, A., Cesani, M., Pepe, S., Fasano, S., Gregori, S., Tononi, L., Biffi, A. *et al.* (2007). Safety of arylsulfatase A overexpression for gene therapy of metachromatic leukodystrophy. *Human Gene Therapy*, volume 18, numéro 9, p. 821-836.
- Chimenti, C., Pieroni, M., Morgante, E., Antuzzi, D., Russo, A., Russo, M. A., Maseri, A. et Frustaci, A. (2004). Prevalence of Fabry disease in female patients with late-onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, volume 110, numéro 9, p. 1047-1053.
- Clarke, J. T. (2007). Narrative review: Fabry disease. *Annals of Internal Medicine*, volume 146, numéro 6, p. 425-433.
- Clarke, L. A., Clarke, J. T., & Sirns, S. (2004). Fabry disease: recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy in Canada.
- Clavelou, P., et Besson, G. (2007). Neurological aspects of Fabry disease. *Presse Medicale*, volume 36, numéro 1, p. 1S65-8.
- Cole, A. L., Lee, P. J., Hughes, D. A., Deegan, P. B., Waldek, S., et Lachmann, R. H. (2007). Depression in adults with Fabry disease: a common and under-diagnosed problem. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, volume 30, numéro 6, p. 943-951.
- Cooper, G. M., et Hausman, R. E., 1947 (2007). *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Press, Sunderland, MA; Washington, DC.
- Cox, T. M. (2006). Biomarkers in lysosomal storage diseases. Dans Mehta, A., Beck, M. et Sunder-Plassmann, G., *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis, Oxford.
- Cox, T. M., et Cachon-Gonzalez, M. B. (2012). The cellular pathology of lysosomal diseases. *The Journal of Pathology*, volume 226, numéro 2, p. 241-254.
- Crosbie, T. W., Packman, W., et Packman, S. (2009). Psychological aspects of patients with Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, volume 32, numéro 6, p. 745-753.
- Deegan, P. B., Baehner, A. F., Barba Romero, M. A., Hughes, D. A., Kampmann, C., Beck, M. (2006). Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey. *Journal of Medical Genetics*, volume 43, numéro 4, p. 347-352.
- Desnick, R. J., Brady, R., Barranger, J., Collins, A. J., Germain, D. P., Goldman, M., Grabowski, G., Packman, S., et Wilcox, W. R. (2003). Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis,

- management, and enzyme replacement therapy. *Annals of Internal Medicine*, volume 138, numéro 4, p. 338-346.
- Desnick, R. J., et Brady, R. O. (2004). Fabry disease in childhood. *The Journal of Pediatrics*, volume 144, numéro 5, p. S20-6.
- Dhall, A., et Chatterjee, C. (2011). Chemical approaches to understand the language of histone modifications. *ACS Chemical Biology*, volume 6, numéro 10, p. 987-999.
- Dupont, F. O., Gagnon, R., Boutin, M., et Auray-Blais, C. (2013). A metabolomic study reveals novel plasma lyso-Gb₃ analogs as Fabry disease biomarkers. *Current Medicinal Chemistry*, volume 20, numéro 2, p. 280-288.
- Eng, C. M., Guffon, N., Wilcox, W. R., Germain, D. P., Lee, P., Waldek, S., Caplan, L., Linthorst, G. E., Desnick, R. J. (2001). Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A--replacement therapy in Fabry's disease. *The New England Journal of Medicine*, volume 345, numéro 1, p. 9-16.
- Fan, J. Q., et Ishii, S. (2007). Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease. Yin and Yang of enzyme inhibitors. *The FEBS Journal*, volume 274, numéro 19, p. 4962-4971.
- Finkelstein, J. D. (2007). Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC*, volume 45, numéro 12, p. 1694-1699.
- Frustaci, A., Chimenti, C., Ricci, R., Natale, L., Russo, M. A., Pieroni, M., Eng, C. M., et Desnick, R. J. (2001). Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy. *The New England journal of Medicine*, volume 345, numéro 1, p. 25-32.
- Futerman, A. H., et van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature reviews: Molecular Cell Biology*, volume 5, numéro 7, p. 554-565.
- Garman, S. C., et Garboczi, D. N. (2004). The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *Journal of Molecular Biology*, volume 337, numéro 2, p. 319-335.
- Gavin, Y., Iwanochko, R.M., et Gordon, M. (2007). La cardiomyopathie conséquent à la maladie de Fabry : diagnostic, pathophysiologie et rôle de la thérapie enzymatique substitutive, *Cardiologie, Conférences scientifiques*, volume X11, numéro 2, p.1-6.
- Gelb, M. H., Scott, C. R. et Turecek, F. (2014). Newborn Screening for Lysosomal Storage Diseases. *Clinical Chemistry*, volume 61, numéro 2, p. 335-346.

- Germain, D. P. (2000). La maladie de Fabry. Aspects cliniques et génétiques. Perspectives thérapeutiques. *La Revue de Médecine Interne*, volume 21, numéro 12, p. 1086-1103.
- Germain, D. P. (2010). Fabry disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, volume 5, p. 30-1172-5-30.
- Giacomini, P. S., Shannon, P. T., Clarke, J. T., et Jaigobin, C. (2004). Fabry's disease presenting as stroke in a young female. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, volume 31, numéro 1, p. 112-114.
- Gross, J. H., et SpringerLink (2011). *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Gutierrez-Amavizca, B. E., Orozco-Castellanos, R., Padilla-Gutierrez, J., Valle, Y., et Figuera, L. E. (2014). Pedigree analysis of Mexican families with Fabry disease as a powerful tool for identification of heterozygous females. *Genetics and Molecular Research*, volume 13, numéro 3, p. 6752-6758.
- Hendriksz, C. J., Burton, B., Fleming, T. R., Harmatz, P., Hughes, D., Jones, S. A., *et al.* (2014). Efficacy and safety of enzyme replacement therapy with BMN 110 (elosulfase alfa) for Morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA): a phase 3 randomised placebo-controlled study. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, volume 37, numéro 6, p. 979-990.
- HGMD (2014). Human Gene Mutation Database. Dans <http://www.hgmd.org/> (page consultée le 5 mai 2015).
- Hoffmann, E. D. et Stroobant, V. (2002). *Mass spectrometry: Principles And Applications*. Wiley, Chichester; New York.
- Hollak C.E., et Weinreb N.J. (2015). The attenuated/late onset lysosomal storage disorders: Therapeutic goals and indications for enzyme replacement treatment in Gaucher and Fabry disease. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, volume 29, numéro 2, p. 205-218.
- Hollander *et al.* (2015). Gender-specific plasma proteomic biomarkers in patients with Anderson-Fabry disease. *European journal of heart failure*, volume 17, numéro 3, p. 291-300.
- Hwu, W. L., Chien, Y. H., Lee, N. C., Chiang, S. C., Dobrovolny, R., Huang, A. C., Yeh, H. Y., Chao, M. C., Lin, S. J., Kitagawa, T., Desnick, R. J., et Hsu, L. W. (2009). Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Human Mutation*, volume 30, numéro 10, p. 1397-1405.

- Iemolo, F., Pizzo, F., Albeggiani, G., Zizzo, C., Colomba, P., Scalia, S., Bartolotta, C., et Duro, G. (2014). De novo mutation in a male patient with Fabry disease: a case report. *BMC Research Notes*, volume 7, numéro 1, p. 11.
- Kampmann, C., Kalkum, G., Beck, M., et Whybra, C. (2013). Successful long-term enzyme replacement therapy in a young adult with Fabry disease. *Clinical Genetics*, volume 83, numéro 4, p. 395-396.
- Kebarle P. (2000). A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, volume 35, numéro 7, p. 804-817.
- Kes, V. B., Cesarik, M., Zavoreo, I., Soldo-Butkovic, S., Kes, P., Basic-Jukic, N., Racki, S., Jakic, M., Delic-Brkljacic, D., Jukic, Z., Trkanjec, Z., Seric, V., Solter, V. V., Bielen, I., Basic, S., Demarin, V., Croatian Society for Neurovascular Disorders of Croatian Medical Association, Croatian Society of Neuroimmunology and Neurogenetics, Croatian Society of Neurology of Croatian Medical Association et Croatian Society of Nephrology, Dialysis and Transplantation of Croatian Medical Association (2013). Guidelines for diagnosis, therapy and follow up of Anderson-Fabry disease. *Acta clinica Croatica*, volume 52, numéro 3, p. 395-405.
- Keshav, S. (2006). Gastrointestinal manifestations of Fabry disease. Dans Mehta, A., Beck, M. et Sunder-Plassmann, G., *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis, Oxford.
- Khamis, M. M., Adamko, D. J., et El-Aneed, A. (2015). Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery. *Mass Spectrometry Reviews*.
- Kitagawa, T., Ishige, N., Suzuki, K., Owada, M., Ohashi, T., Kobayashi, M., Eto, Y., Tanaka, A., Mills, K., Winchester, B., et Keutzer, J. (2005). Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism*, volume 85, numéro 3, p. 196-202.
- Kruger, R., Tholey, A., Jakoby, T., Vogelsberger, R., Monnikes, R., Rossmann, H., Beck, M., et Lackner, K. J. (2012). Quantification of the Fabry marker lyso-Gb₃ in human plasma by tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, volume 883-884, p. 128-135.
- Michaud, L. et Auray-Blais, C. (2012). Improved ways to screen for patients with Fabry disease, involving optometry in a multidisciplinary approach. *Canadian Journal of Optometry*, volume 74, numéro 4, p. 25.
- Mills, K., Morris, P., Lee, P., Vellodi, A., Waldek, S., Young, E., et Winchester, B. (2005). Measurement of urinary CDH and CTH by tandem mass spectrometry in patients

- hemizygous and heterozygous for Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, volume 28, numéro 1, p. 35-48.
- Laney, D. A., Bennett, R. L., Clarke, V., Fox, A., Hopkin, R. J., Johnson, J., O'Rourke, E., Sims, K. et Walter, G. (2013). Fabry disease practice guidelines: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *Journal of Genetic Counseling*, volume 22, numéro 5, p. 555-564.
- Lavoie, P., Boutin, M. et Auray-Blais, C. (2013). Multiplex analysis of novel urinary lyso-Gb₃-related biomarkers for Fabry disease by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, volume 85, numéro 3, p. 1743-1752.
- Lin, H. Y., Chong, K. W., Hsu, J. H., Yu, H. C., Shih, C. C., Huang, C. H., Niu, D. M. *et al.* (2009). High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, CIRCGENETICS-109.
- Linthorst, G. E., Hollak, C. E., Korevaar, J. C., Van Manen, J. G., Aerts, J. M. et Boeschoten, E. W. (2003). alpha-Galactosidase A deficiency in Dutch patients on dialysis: a critical appraisal of screening for Fabry disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, volume 18, numéro 8, p. 1581-1584.
- Linthorst, G. E., Vedder, A. C., Aerts, J. M. et Hollak, C. E. (2005). Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clinica Chimica Acta*, volume 353, numéro 1-2, p. 201-203.
- Linthorst, G.E., Bouwman, M.G., Wijburg, F.A., Aerts, J.M., Poorthuis, B.J., Hollak, C.E. (2010). Screening for Fabry disease in high-risk populations: a systematic review. *Journal of Medical Genetics*, volume 47, numéro 4, p. 217-222.
- Lohse, B., Kristensen, J. L., Kristensen, L. H., Agger, K., Helin, K., Gajhede, M. et Clausen, R. P. (2011). Inhibitors of histone demethylases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, volume 19, numéro 12, p. 3625-3636.
- MacDermot, K. D., Holmes, A. et Miners, A. H. (2001). Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *Journal of Medical Genetics*, volume 38, numéro 11, p. 769-775.
- Manwaring, V., Boutin, M. et Auray-Blais, C. (2013). A metabolomic study to identify new globotriaosylceramide-related biomarkers in the plasma of Fabry disease patients. *Analytical Chemistry*, volume 85, numéro 19, p. 9039-9048.
- Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V., Shevchenko, A. et Schwudke, D. (2008). Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*, volume 49, numéro 5, p. 1137-1146.

- Mehta, A. B. et Winchester, B. (2012). *Lysosomal storage disorders: a practical guide*. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex.
- Mehta, A.B., Beck, M., et Sunder-Plassmann, G. (2006). *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*, Oxford édition.
- Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E. et Carey, W. F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *Journal of the American Medical Association*, volume 281, numéro 3, p. 249-254.
- Michaud, L. (2013). Vascular tortuosities of the upper eyelid: a new clinical finding in Fabry patient screening. *Journal of Ophthalmology*, volume 2013, p. 207573.
- Mills, K., Morris, P., Lee, P., Vellodi, A., Waldek, S., Young, E. et Winchester, B. (2005). Measurement of urinary CDH and CTH by tandem mass spectrometry in patients hemizygous and heterozygous for Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, volume 28, numéro 1, p. 35-48.
- MLD Foundation (2015). <http://www.mldfoundation.org/research-gene-therapy.html> (page consultée le 3 juillet 2015).
- Mu, T. W., Ong, D. S., Wang, Y. J., Balch, W. E., Yates, J. R., 3rd, Segatori, L. et Kelly, J. W. (2008). Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases. *Cell*, volume 134, numéro 5, p. 769-781.
- Nagueh, S. F. (2014). Anderson-Fabry disease and other lysosomal storage disorders. *Circulation*, volume 130, numéro 13, p. 1081-1090.
- Nakao, S., Kodama, C., Takenaka, T., Tanaka, A., Yasumoto, Y., Yoshida, A., Kanzaki, T., Enriquez, A. L., Eng, C. M., Tanaka, H., Tei, C. et Desnick, R. J. (2003). Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney International*, volume 64, numéro 3, p. 801-807.
- Nakao, S., Takenaka, T., Maeda, M., Kodama, C., Tanaka, A., Tahara, M., Yoshida, A., Kuriyama, M., Hayashibe, H. et Sakuraba, H. (1995). An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *The New England Journal of Medicine*, volume 333, numéro 5, p. 288-293.
- Orteu, C. H., Jansen, T., Lidove, O., Jaussaud, R., Hughes, D. A., Pintos-Morell, G., Ramaswami, U., Parini, R., Sunder-Plassman, G., Beck, M., Mehta, A. B. et FOS Investigators (2007). Fabry disease and the skin: data from FOS, the Fabry outcome survey. *The British Journal of Dermatology*, volume 157, numéro 2, p. 331-337.
- Parenti, G., Andria, G. et Ballabio, A. (2015). Lysosomal storage diseases: from pathophysiology to therapy. *Annual Review of Medicine*, volume 66, p. 471-486.

- Parenti, G., Moracci, M., Fecarotta, S. et Andria, G. (2014). Pharmacological chaperone therapy for lysosomal storage diseases. *Future Medicinal Chemistry*, volume 6, numéro 9, p. 1031-1045.
- Patti, G. J., Yanes, O., Shriver, L. P., Courade, J. P., Tautenhahn, R., Manchester, M. et Siuzdak, G. (2012). Metabolomics implicates altered sphingolipids in chronic pain of neuropathic origin. *Nature Chemical Biology*, volume 8, numéro 3, p. 232-234.
- Pesce, A. J. et Kaplan, L. A., (1984). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation*. Mosby, St. Louis.
- Pisani, A., Visciano, B., Roux, G. D., Sabbatini, M., Porto, C., Parenti, G. et Imbriaco, M. (2012). Enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: state of the art and review of the literature. *Molecular Genetics and Metabolism*, volume 107, numéro 3, p. 267-275.
- Platt, F. M. et Jeyakumar, M. (2008). Substrate reduction therapy. *Acta Paediatrica*, volume 97, numéro 457, p. 88-93.
- Qin, G., Takenaka, T., Telsch, K., Kelley, L., Howard, T., Levade, T., Deans, R., Howard, B. H., Malech, H. L., Brady, R. O. et Medin, J. A. (2001). Preselective gene therapy for Fabry disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 98, numéro 6, p. 3428-3433.
- Ramaswami, U., Parini, R., Pintos-Morell, G., Kalkum, G., Kampmann, C., Beck, M. et FOS Investigators (2012). Fabry disease in children and response to enzyme replacement therapy: results from the Fabry Outcome Survey. *Clinical Genetics*, volume 81, numéro 5, p. 485-490.
- Read, A. P. et Donnai, D. (2009). *Génétique médicale: de la biologie à la pratique clinique*. De Boeck, Bruxelles.
- Reece, J. B., 1944 et Campbell, N. A., 1946 (2012). *Campbell biologie*. ERPI, Montréal; Saint-Laurent, Québec.
- Ries, M., Ramaswami, U., Parini, R., Lindblad, B., Whybra, C., Willers, I., Gal, A. et Beck, M. (2003). The early clinical phenotype of Fabry disease: a study on 35 European children and adolescents. *European Journal of Pediatrics*, volume 162, numéro 11, p. 767-772.
- Rolfs, A., Bottcher, T., Zschiesche, M., Morris, P., Winchester, B., Bauer, P., Walter, U., Mix, E., Lohr, M., Harzer, K., Strauss, U., Pahnke, J., Grossmann, A. et Benecke, R. (2005). Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet*, volume 366, numéro 9499, p. 1794-1796.

- Rombach, S. M., Dekker, N., Bouwman, M. G., Linthorst, G. E., Zwinderman, A. H., Wijburg, F. A., Kuiper, S., Vd Bergh Weerman, M. A., Groener, J. E., Poorthuis, B. J., Hollak, C. E. et Aerts, J. M. (2010). Plasma globotriaosylsphingosine: diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochimica and Biophysica Acta*, volume 1802, numéro 9, p. 741-748.
- Sachdev, B., Takenaka, T., Teraguchi, H., Tei, C., Lee, P., McKenna, W. J. et Elliott, P. M. (2002). Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, volume 105, numéro 12, p. 1407-1411.
- Saudubray, J. M., Van den Berghe, G., et Walter, J. (2012). *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. Springer, Berlin.
- Schiffmann, R. (2010). Agalsidase treatment for Fabry disease: uses and rivalries. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, volume 12, numéro 11, p. 684-685.
- Schiffmann, R. (2015). The consequences of genetic and pharmacologic reduction in sphingolipid synthesis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, volume 38, numéro 1, p. 77-84.
- Schiffmann, R., Askari, H., Timmons, M., Robinson, C., Benko, W., Brady, R. O. et Ries, M. (2007). Weekly enzyme replacement therapy may slow decline of renal function in patients with Fabry disease who are on long-term biweekly dosing. *Journal of the American Society of Nephrology*, volume 18, numéro 5, p. 1576-1583.
- Schiffmann, R., Forni, S., Swift, C., Brignol, N., Wu, X., Lockhart, D. J., Blankenship, D., Wang, X., Grayburn, P. A., Taylor, M. R., Lowes, B. D., Fuller, M., Benjamin, E. R. et Sweetman, L. (2014). Risk of death in heart disease is associated with elevated urinary globotriaosylceramide. *Journal of the American Heart Association*, volume 3, numéro 1, p. e000394.
- Schiffmann, R., Kopp, J. B., Austin, H. A., 3rd, Sabnis, S., Moore, D. F., Weibel, T., Balow, J. E. et Brady, R. O. (2001). Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, volume 285, numéro 21, p. 2743-2749.
- Schiffmann, R., Swift, C., Wang, X., Blankenship, D. et Ries, M. (2015). A prospective 10-year study of individualized, intensified enzyme replacement therapy in advanced Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, p.1-8.
- Shabbeer, J., Yasuda, M., Benson, S. D. et Desnick, R. J. (2006). Fabry disease: identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Human Genomics*, volume 2, numéro 5, p. 297-309.

- Shen, J. S., Meng, X. L., Moore, D. F., Quirk, J. M., Shayman, J. A., Schiffmann, R. et Kaneski, C. R. (2008). Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Molecular Genetics and Metabolism*, volume 95, numéro 3, p. 163-168.
- Shrader, S. (2014). *Introductory mass spectrometry*. Taylor and Francis, Boca Raton.
- Sirrs, S., Clarke, J. T., Bichet, D. G., Casey, R., Lemoine, K., Flowerdew, G., Sinasac, D. S. et West, M. L. (2010). Baseline characteristics of patients enrolled in the Canadian Fabry Disease Initiative. *Molecular Genetics and Metabolism*, volume 99, numéro 4, p. 367-373.
- Sirrs, S. M., Bichet, D. G., Casey, R., Clarke, J. T., Lemoine, K., Doucette, S., West, M. L. et al. (2014). Outcomes of patients treated through the Canadian Fabry disease initiative. *Molecular Genetics and Metabolism*, volume 111, numéro 4, p. 499-506.
- Siuzdak, G. (2006). *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*. MCC Press, San Diego.
- Smid, B. E., van der Tol, L., Biegstraaten, M., Linthorst, G. E., Hollak, C. E. et Poorthuis, B. J. (2015). Plasma globotriaosylsphingosine in relation to phenotypes of Fabry disease. *Journal of Medical Genetics*, p. jmedgenet-2014-102872.
- Sodi, A., Ioannidis, A. S., Mehta, A., Davey, C., Beck, M. et Pitz, S. (2007). Ocular manifestations of Fabry's disease: data from the Fabry Outcome Survey. *The British Journal of Ophthalmology*, volume 91, numéro 2, p. 210-214.
- Spada, M., Pagliardini, S., Yasuda, M., Tukel, T., Thiagarajan, G., Sakuraba, H., Ponzzone, A. et Desnick, R. J. (2006). High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *American Journal of Human Genetics*, volume 79, numéro 1, p. 31-40.
- Sweeley, C. C. et Klionsky, B. (1963). Fabry's Disease: Classification as a Sphingolipidosis and Partial Characterization of a Novel Glycolipid. *The Journal of Biological Chemistry*, volume 238, p. 3148-3150.
- Takenaka, T., Murray, G. J., Qin, G., Quirk, J. M., Ohshima, T., Qasba, P., Clark, K., Kulkarni, A. B., Brady, R. O. et Medin, J. A. (2000). Long-term enzyme correction and lipid reduction in multiple organs of primary and secondary transplanted Fabry mice receiving transduced bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 97, numéro 13, p. 7515-7520.
- Van der Tol, L., Cassiman, D., Houge, G., Janssen, M. C., Lachmann, R. H., Linthorst, G. E., Ramaswami, U., Sommer, C., Tondel, C., West, M. L., Weidemann, F., Wijburg, F. A., Svarstad, E., Hollak, C. E. et Biegstraaten, M. (2014). Uncertain Diagnosis of Fabry Disease in Patients with Neuropathic Pain, Angiokeratoma or Cornea

- Verticillata: Consensus on the Approach to Diagnosis and Follow-Up. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Volume 17, p. 83-90.
- Van Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I. et Michotte, Y. (2009). Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *Journal of chromatography.B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, volume 877, numéro 23, p. 2198-2207.
- Vedder, A. C., Linthorst, G. E., van Breemen, M. J., Groener, J. E., Bemelman, F. J., Strijland, A., Mannens, M. M., Aerts, J. M. et Hollak, C. E. (2007). The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb₃ levels. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, volume 30, numéro 1, p. 68-78.
- Watson, J. T. et Sparkman, O. D. (2007). *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- Weidemann, F., Breunig, F., Beer, M., Sandstede, J., Stork, S., Voelker, W., Ertl, G., Knoll, A., Wanner, C. et Strotmann, J. M. (2005). The variation of morphological and functional cardiac manifestation in Fabry disease: potential implications for the time course of the disease. *European Heart Journal*, volume 26, numéro 12, p. 1221-1227.
- West, M., Dyack, S., Riddell, C., Lemoine, K., Camfield, C. et Camfield, P. (2002). A Nova Scotia kindred with Fabry disease. *Acta Paediatrica*, volume 91, numéro 439, p. 116-116.
- Whitfield, P. D., Calvin, J., Hogg, S., O'Driscoll, E., Halsall, D., Burling, K., Maguire, G., Wright, N., Cox, T. M., Meikle, P. J. et Deegan, P. B. (2005). Monitoring enzyme replacement therapy in Fabry disease--role of urine globotriaosylceramide. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, volume 28, numéro 1, p. 21-33.
- Whybra, C., Kampmann, C., Willers, I., Davies, J., Winchester, B., Kriegsmann, J., Bruhl, K., Gal, A., Bunge, S. et Beck, M. (2001). Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of disease in female heterozygotes. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, volume 24, numéro 7, p. 715-724.
- Wilcox, W. R., Banikazemi, M., Guffon, N., Waldek, S., Lee, P., Linthorst, G. E., Desnick, R. J., Germain, D. P. et International Fabry Disease Study Group (2004). Long-term safety and efficacy of enzyme replacement therapy for Fabry disease. *American Journal of Human Genetics*, volume 75, numéro 1, p. 65-74.
- Winchester, B., Young, E. (2006). Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease. Dans Mehta, A., Beck, M. et Sunder-Plassmann, G., *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis, Oxford.

- Yoshitama, T., Nakao, S., Takenaka, T., Teraguchi, H., Sasaki, T., Kodama, C., Tanaka, A., Kisanuki, A. et Tei, C. (2001). Molecular genetic, biochemical, and clinical studies in three families with cardiac Fabry's disease. *The American Journal of Cardiology*, volume 87, numéro 1, p. 71-75.
- Young, E., Mills, K., Morris, P., Vellodi, A., Lee, P., Waldek, S. et Winchester, B. (2005). Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta paediatrica*, volume 94, numéro 447, p. 51-54.
- Zampetti, A., Orteu, C. H., Antuzzi, D., Bongiorno, M. R., Manco, S., Gnarra, M., Morrone, A., Cardinali, G., Kovacs, D., Aspite, N., Linder, D., Parini, R., Feliciani, C. *et al.* (2012). Angiokeratoma: decision-making aid for the diagnosis of Fabry disease. *The British Journal of Dermatology*, volume 166, numéro 4, p. 712-720.